

**POTENSI EKSTRAK ETANOL TANAMAN PEGAGAN  
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI MDA SEL  
SPERMATOGENIK DAN HISTOPATOLOGI  
TESTIS TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)  
USIA TUA**

**SKRIPSI**

Oleh:

**RISALIA ELITE DITYASARI  
145130101111067**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

**POTENSI EKSTRAK ETANOL TANAMAN PEGAGAN  
(*Centella asiatica*) TERHADAP EKSPRESI MDA SEL  
SPERMATOGENIK DAN HISTOPATOLOGI  
TESTIS TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)  
USIA TUA**

**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**RISALIA ELITE DITYASARI  
145130101111067**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

## LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap  
Ekspresi MDA Sel Spermatogenik dan Histopatologi Testis  
Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Usia Tua

Oleh :  
**Risalia Elite Dityasari**  
**145130101111067**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 9 Januari 2018  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**

NIP. 19600903 198802 2 001

**drh. Fajar Shodiq P, M.Biotech**

NIP. 19870501 201504 2 001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**

NIP. 19600903 198802 2 001

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Risalia Elite Dityasari

NIM : 145130101111067

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

**Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi MDA Sel Spermatogenik dan Histopatologi Testis Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Usia Tua**

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang,  
Yang menyatakan,

(Risalia Elite Dityasari)  
NIM.145130101111067

**Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap  
Ekspresi MDA Sel Spermatogenik dan Histopatologi  
Testis Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Usia Tua**

**ABSTRAK**

Penuaan atau proses *aging* yang alami diakibatkan karena bertambahnya usia makhluk hidup. Penuaan terjadi karena akumulasi kerusakan sel dan peningkatan radikal bebas sehingga kadar stress oksidatif tinggi. Stres oksidatif menyebabkan peroksidasi lipid yang berakibat terjadi kenaikan MDA dan kerusakan DNA spermatozoa, sehingga dapat mengganggu proses meiosis dalam spermatogenesis. Ekstrak etanol tanaman pegagan *Centella asiatica* mengandung senyawa flavonoid sebagai antioksidan dan fitosterol sebagai profertilitas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak tanaman pegagan terhadap ekspresi MDA dan gambaran histopatologi testis pada tikus (*Rattus novergicus*) usia tua. Penelitian menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sparague Dawley* (SD) yang dibagi menjadi lima kelompok, yaitu : kelompok kontrol negatif yaitu tikus muda yang berusia 3 bulan, kelompok kontrol positif yaitu tikus tua yang berusia 2 tahun, kelompok perlakuan dengan tikus usia 2 tahun yang diberi ekstrak etanol *Centella asiatica* dengan dosis 100 mg/kg BB, dosis 200 mg/kg BB, dan dosis 300 mg/kg BB sebanyak 1 mL. Parameter yang diukur adalah ekspresi MDA pada sel spermatogenik yang diwarnai dengan metode Imunohistokimia (IHK) dan histopatologi testis yang diwarnai dengan pewarnaan Hematoxylin-Eosin (HE). Analisa data ekspresi MDA dilakukan secara statistik dengan *one-way* ANOVA dan analisa data histopatologi dilakukan secara deskriptif dengan melihat gambaran tubulus seminiferus. Hasil penelitian menunjukkan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan pada tikus jantan usia tua secara signifikan dengan  $\alpha=0,05$  dapat memperbaiki kerusakan pada tubulus seminiferus testis dan menghambat peningkatan ekspresi MDA dengan dosis efektif 200 mg/kg BB. Kesimpulan penelitian ini ekstrak etanol tanaman pegagan dapat memperbaiki proses spermatogenesis berdasarkan perbaikan kerusakan tubulus seminiferus dan penurunan ekspresi MDA.

**Kata kunci :** Penuaan, Ekstrak etanol *Centella asiatica*, Malondialdehida (MDA), Histologi testis.

**The Potency of Ethanol Extract Pegagan (*Centella asiatica*) to Expression of MDA Spermatogenic Cells and Testis Histopathology on Old Rats (*Rattus novergicus*)**

**ABSTRACT**

Aging or natural aging process is caused by increasing age of living things. Aging occurs by the accumulation of damage in cells by increasing free radical due to high oxidative stress. Oxidative stress causes lipid peroxidation resulting in increased MDA and damage the DNA spermatozoa, which may interfere with meiosis in spermatogenesis. The ethanol extract of *Centella asiatica* contains flavonoid as antioxidant and phytosterol as profertilitas. This research was aimed to know the effect of ethanol extract *Centella asiatica* to MDA expression and testis histopathology on old rats (*Rattus novergicus*). This research used *Sparague Dawley* (SD) male rats (*Rattus novergicus*) divided into five groups : negative control group which young rats about 3 months, positive control group which old rats about 2 years, experiment groups which rats about 2 years were given ethanol extract of *Centella asiatica* with dose of 100 mg/kg BW, dose of 200 mg/kg BW, and dose of 300 mg/kg BW were given 1 mL. The parameters measured were the expression of MDA on spermatogenic cells was stained by Immunohistochemistry (IHC) staining and histopathology of testis was stained by Hemaxtoxylin Eosin (HE). MDA expressions were analized using one-way ANOVA and histopathology were descriptive analized on tubulic seminiferus. The result showed that supplementation of extract etanol pegagan in old rat significantly ( $\alpha=0,05$ ) decrease expression of MDA with an effective dose of 200 mg/kg BW and also can repair the damage of seminiferi tubuli testis and The conclusion of this research are, the suplemementation of extract etanol pegagan can repair spermatogenesis process based on the inhibition of seminiferi tubulic damage and decrease MDA expression.

**Key word :** Aging, Ethanol Extract *Centella asiatica*, Malondialdehyde (MDA), Testis Histologic.



## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan berkat dan anugrah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Potensi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Ekspresi MDA Sel Spermatogenik dan Spermatogenesis pada Jaringan Testis Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Usia Tua” ini dapat terselesaikan.

Selama menyusun skripsi, penulis banyak mendapatkan arahan, bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku dosen pembimbing I dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan laporan ini.
2. drh. Fajar Shodiq P, M.Biotech selaku dosen pembimbing II yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan laporan ini.
3. drh. Wawid Purwatiningsih, M. Vet dan drh. Albiruni Haryo, M. Sc selaku dosen penguji I yang telah memberikan saran, kritik, masukan serta dukungan kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.
4. drh. Desi Wulansari, M. Vet dan drh. Dyah Ayu O A P, M. Biotech selaku dosen penguji II yang telah memberikan saran, kritik, masukan serta dukungan kepada penulis dalam penyempurnaan skripsi ini.
5. Keluarga penulis, Ayah Sunyono, Ibu Harini Huta Nirbayun, Adik Andini Aulia Mirella, yang selalu memberi kasih sayang, dorongan dan dukungan untuk menyelesaikan skripsi serta perhatiannya akan kebutuhan saya baik secara moril maupun materi.

6. Teman sejawat dalam pelaksanaan penelitian ini “Esti, Ganang, Aldi, Deden dan Bay” yang bekerjasama dengan baik, serta selalu memberikan dukungan yang tak henti-henti.
7. Teman-teman Deer (2014 D), khususnya Nayo, Esti, Nur Haya, Citra, Windy, Merry, dan Luica yang selalu mendukung penulis dalam menyelesaikan laporan ini.
8. Teman-teman tim Korlap “Kak Nana, Kak Yudi, Kak Yehez, dan Kak Vivi” yang selalu memberikan keceriaan, menghilangkan rasa galau dan mendukung penulis menyelesaikan proposal skripsi dengan tepat waktu.
9. Rekan-rekan UBE (*Universitas Brawijaya Equinary*) yang selalu memberikan semangat dan keceriaan dalam menyelesaikan skripsi ini.

Akhir kata, penulis berharap semoga ALLAH S.W.T. membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan hasil dari penelitian ini dapat memberikan manfaat dan menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca.

Malang, Januari 2018

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan Penelitian .....	4
1.5 Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1 Penuaan ( <i>Aging</i> ) .....	6
2.1.1. Tahap Proses Penuaan .....	7
2.1.2. Teori Penuaan .....	8
2.2 Tanaman Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) .....	9
2.2.1. Kandungan Tanaman Pegagan .....	11
2.2.2. Tanaman Pegagan sebagai Antioksidan .....	11
2.2.3. Tanaman Pegagan sebagai Profertilitas .....	13
2.3. Hewan coba tikus ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	14
2.3.1 Konversi Umur Tikus .....	16
2.4. Malondialdehida (MDA) .....	17
2.5. Testis .....	20
2.5.1 Sel Sertoli .....	22
2.6 . Spermatogenesis .....	25
2.6.1. Peran Hormon pada Spermatogenesis .....	28
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....	30
3.1 Kerangka Konseptual .....	30
3.2 Hipotesis Penelitian .....	33
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b> .....	34
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	34
4.2 Sampel Penelitian .....	34
4.3 Rancangan Penelitian .....	35
4.4 Variabel Penelitian .....	36
4.5 Materi Penelitian .....	36
4.5.1. Alat .....	36

4.5.2. Bahan .....	36
4.6. Tahapan Penelitian .....	37
4.6.1. Preparasi Hewan Coba .....	37
4.6.2. Pembuatan Ekstrak Etanol <i>Centella asiatica</i> .....	37
4.6.3. Pemberian Ekstrak Etanol <i>Centella asiatica</i> pada Hewan Coba .....	38
4.6.4. Pengambilan Sampel Organ Testis .....	38
4.6.5. Pembuatan Preparat Histologi Jaringan Testis .....	39
4.6.6. Pewarnaan Preparat Histologi Jaringan Testis dengan Metode HE .....	39
4.6.7. Pengamatan Preparat Histologis Jaringan Testis .....	40
4.6.8. Analisis Ekspresi MDA pada Sel Spermatogenik dengan Metode IHK .....	40
4.6.8. Analisis Data .....	43
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	44
5.1. Potensi Ekstrak Tanaman Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) Terhadap Ekspresi MDA Sel Spermatogenik Jaringan Testis Tikus Putih ( <i>Rattus novergicus</i> ) .....	44
5.2. Potensi Ekstrak Tanaman Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) Terhadap Spermatogenesis Jaringan Testis Tikus Putih ( <i>Rattus novergicus</i> ) .....	53
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	63
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	64
<b>LAMPIRAN</b> .....	69

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Kandungan Nutrisi Pegagan .....	11
2.2. Data Biologi Tikus .....	15
2.3. Hubungan Antara Umur Tikus dan Umur Manusia.....	17
4.1. Kelompok Perlakuan pada Penelitian .....	35
5.1. Hasil uji <i>tukey</i> Ekspresi MDA jaringan testis.....	47



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Tanaman Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> ) .....	10
2.2. Tikus Putih ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	14
2.3. Mekanisme Lipid Peroksidasi .....	18
2.4. Anatomi Testis.....	21
2.5. Histologi Tubulus Seminiferus normal .....	23
2.6. Penampang Histologi sel Leydig dan Sel Sertoli .....	24
2.7. Proses Spermatogenesis .....	27
3.1. Kerangka konsep penelitian .....	30
5.1. Hasil Imunohistokimia Jaringan Testis .....	46
5.2. Gambaran Histologis Penampang Melintang Testis Kontrol Negatif ....	54
5.3. Gambaran Histologis Penampang Melintang Testis Kontrol Positif.....	55
5.4. Gambaran Histologis Penampang Melintang Testis Perlakuan 1 .....	56
5.5. Gambaran Histologis Penampang Melintang Testis Perlakuan 2.....	57
5.6. Gambaran Histologis Penampang Melintang Testis Perlakuan 1 .....	58



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Penelitian .....	71
2. Pembuatan Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan .....	72
3. Perhitungan Dosis Terapi Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan .....	73
4. Pembuatan Preparat Histologis Testis dengan HE .....	75
5. Metode Imunohistokimia .....	76
6. Sertifikat Laik Etik Penelitian .....	77
7. Determinasi Tanaman Pegagan .....	78
6. Hasil Uji Statistika .....	79



## DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Ab	: Antibodi
ABP	: <i>Androgen Binding Protein</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
AOAC	: <i>Association of Official Analytical Chemists</i>
BB	: Berat Badan
DNA	: <i>Deoxyribonucleid Acid</i>
FSH	: <i>Folicle Stimulating Hormon</i>
g	: gram
HE	: Hematoxilin Eosin
IHK	: Imunohistokimia
kg	: kilogram
KN	: Kontrol Negatif
KP	: Kontrol Positif
LH	: <i>Luteinizing Hormon</i>
mg	: miligram
mL	: mililiter
μL	: mikroliter
NaCl	: <i>Natrium Chloride</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
PBS	: <i>Phospat Buffered Saline</i>
PFA	: <i>Polysaturated Fatty Acids</i>
Ph	: <i>potential of hydrogen</i>
PO	: Per Oral
PUFA	: <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SD	: Sparague Dawley
TEM	: <i>Transmission Electron Microscopy</i>
TLC	: <i>Thin Layer Chromatography</i>



## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Saat ini prospek usaha breeding ternak maupun hewan kesayangan cukup menjanjikan. Permintaan pangsa pasar masyarakat yang terus meningkat akan berpengaruh langsung terhadap pertumbuhan populasi ternak dan hewan kesayangan. Salah satu faktor yang mendukung peningkatan populasi ternak adalah manajemen reproduksi. Peningkatan usia berpengaruh terhadap tingkat abnormalitas spermatozoa, hal ini disebabkan karena pejantan dengan usia yang semakin tua akan mengalami degenerasi pada sel-sel tubuh termasuk organ reproduksi (Alvionita dkk, 2015).

Penuaan atau proses *aging* merupakan proses alami yang akan dialami semua makhluk hidup di dunia. Banyak teori yang menjelaskan mengapa organisme menjadi tua. Salah satu teori penuaan yang sangat berkembang adalah teori radikal bebas. Teori ini mengatakan bahwa suatu organisme menjadi tua karena akumulasi kerusakan oleh radikal bebas dalam sel sepanjang waktu. Radikal bebas akan merusak molekul sehingga menyebabkan kerusakan sel, gangguan fungsi sel, bahkan kematian sel (Suryohusodo, 2000).

Senyawa MDA dapat dijadikan indikator dari kerusakan membran. Kerusakan pada membran plasma spermatozoa mengakibatkan kematian sel (apoptosis), sel yang mengalami apoptosis dengan cepat diserap oleh sel sertoli sehingga berpengaruh pada jumlah spermatozoa. Hal ini dibuktikan pada penelitian Dairani (2006) bahwa peningkatan kadar MDA akan diikuti oleh penurunan jumlah spermatozoa, karena MDA bersifat toksik sehingga

peningkatan kadar MDA akan menyebabkan kerusakan pada membran plasma spermatozoa yang berakibat pada penurunan jumlah spermatozoa. Untuk mengatasi efek dari penuaan atau *aging* pada tikus tua, maka diperlukan zat yang bersifat antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas yang diakibatkan oleh senyawa tersebut. Salah satu jenis tanaman obat yang dapat dimanfaatkan oleh masyarakat yaitu tanaman pegagan.

Menurut penelitian Lusiana dkk., (2013) tanaman pegagan memiliki kemampuan sebagai bahan profertilitas yang dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa mencit. Tumbuhan pegagan (*Centella asiatica*) memiliki kandungan yang dapat menyuburkan pembentukan spermatozoa. Salah satu senyawa kimia yang terkandung di dalam tanaman pegagan adalah fitosterol. Fitosterol merupakan turunan senyawa sterol sebagai bahan baku pembentuk hormon seksual. Hal ini dapat menyebabkan pada pembentukan spermatozoa jumlahnya menjadi lebih banyak atau meningkat (Samsiar dkk., 2013).

Penelitian ini diharapkan dapat mengetahui potensi ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dalam memperbaiki sel-sel spermatogenik selama proses spermatogenesis pada tikus jantan usia tua. Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) kemudian ekspresi MDA sel spermatogenik diukur dengan metode Imunohistokimia (IHK) dan pembuatan preparat histopatologi jaringan testis tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua menggunakan pewarnaan HE.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut :

1. Apakah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat mempengaruhi ekspresi MDA sel spermatogenik pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua ?
2. Apakah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat mempengaruhi sel-sel spermatogenik selama proses spermatogenesis jaringan testis pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua ?

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) sejumlah 20 ekor dengan usia 2 tahun serta memiliki berat badan 300 gram, dan sejumlah 5 ekor tikus muda dengan usia 3 bulan serta memiliki berat badan 150-200 gram. Telah mendapatkan sertifikat Laik Etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya Malang No : 842-KEP-UB (Lampiran 6).
2. Dosis pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebanyak 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, 300mg/kgBB yang diberikan secara peroral selama 21 hari.
3. Volume pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) yang diberikan sebanyak 1 mL selama 21 hari yang diberikan secara peroral (PO) sesuai dengan kelompok perlakuan. Simplisia tanaman

pegagan telah mendapat determinasi tumbuhan dari UPT Materia Mecida Batu No. 074/373/102.7/2017 (Lampiran 7).

4. Variabel yang diamati yaitu histopatologi testis yang diwarnai dengan pewarnaan *Haematoksilin Eosin* (HE) diamati dengan mikroskop cahaya Olympus BX 51 melalui pembesaran 100x, 400x dan 1000x dianalisa secara deskriptif untuk mengamati sel-sel spermatogenik selama proses spermatogenesis.
5. Pembacaan ekspresi MDA dianalisa dengan metode Imunohistokimia (IHK). Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya dengan 10 lapang pandang, dengan pembesaran 1000x dan dihitung manual dengan melihat sel yang terwarnai coklat (Aulanni'am, 2011).

#### 1.4 Tujuan Penelitian

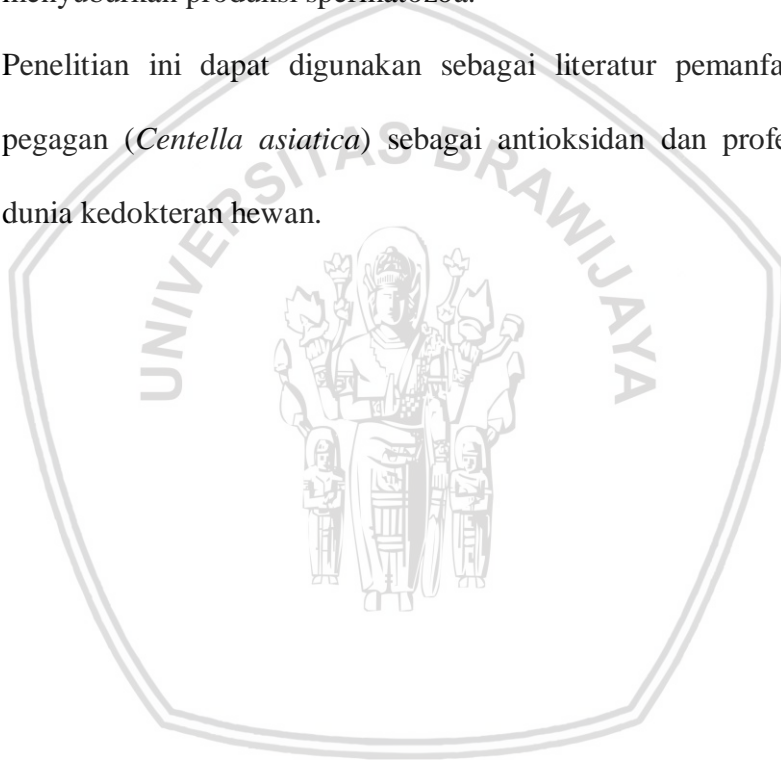
Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat mempengaruhi ekspresi MDA sel spermatogenik pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dapat mempengaruhi sel-sel spermatogenik selama proses spermatogenesis jaringan testis pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan oleh penulis dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai kajian ilmiah pemanfaatan tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebagai antioksidan untuk menangkal radikal bebas akibat penuaan atau *aging* dan sebagai profertilitas untuk menyuburkan produksi spermatozoa.
2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai literatur pemanfaatan tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebagai antioksidan dan profertilitas dalam dunia kedokteran hewan.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Penuaan (*Aging*)

Setiap organisme akan mengalami penuaan atau proses *aging* yang alami diakibatkan oleh bertambahnya usia makhluk hidup. Setelah mencapai usia dewasa, secara alamiah seluruh komponen tubuh tidak berkembang lagi. Dengan semakin bertambahnya usia, maka akan terjadi penurunan berbagai fungsi organ tubuh dan terjadinya perubahan fisik, dari tingkat seluler, organ, hingga sistem karena proses penuaan. Hal ini dapat terjadi pada semua organisme dan tidak dapat dihindari serta berlangsung seiring dengan bertambahnya waktu (Baskoro dan Konthen, 2008).

Terdapat dua macam usia, yaitu usia kronologis dan usia biologis. Usia kronologis adalah usia sebenarnya sesuai dengan tahun kelahiran. Sedangkan yang dimaksud dengan usia fisiologis atau usia biologis ialah sesuai dengan fungsi organ tubuh. Maka usia kronologis tidak selalu sama dengan usia fisiologis (Sunarjo, 2012).

Penuaan pada pria atau pejantan tidak menyebabkan berkurangnya ukuran dan berat testis tetapi sel yang memproduksi dan memberi nutrisi yaitu sel leydig pada sperma akan berkurang. Penurunan jumlah dan aktivitas sel leydig menyebabkan sperma berkurang hingga 50% dan testoteron juga mengalami penurunan. Hal ini menyebabkan penurunan libido dan kegiatan seksual pada pejantan usia tua (Soejono, 2004).



### 2.1.1 Tahap Proses Penuaan

Proses penuaan tidak terjadi begitu saja dengan langsung menampakkan perubahan perubahan fisik dan psikis. Proses penuaan berlangsung melalui tiga tahap sebagai berikut (Pangkahila, 2007) :

#### 1. Tahap Subklinik

Pada tahap ini, sebagian besar hormon di dalam tubuh mulai mengalami penurunan. Hormon yang mengalami penurunan yaitu hormon testosteron, *growth hormon*, dan hormon estrogen. Pembentukan radikal bebas dapat merusak sel dan DNA mulai mempengaruhi tubuh. Kerusakan ini biasanya tidak tampak dari luar. Maka dari itu, pada usia ini masih dianggap usia muda dan normal.

#### 2. Tahap Transisi

Pada tahap ini kadar hormon menurun sampai 25%. Massa otot mulai berkurang sebanyak satu kilogram setiap tahunnya. Pada tahap ini, organisme mulai merasa tidak muda dan tampak lebih tua. Kerusakan oleh radikal bebas mulai merusak ekspresi genetik yang dapat mengakibatkan penyakit seperti kanker, jantung koroner, diabetes, radang sendi hingga berkurangnya memori pada otak.

#### 3. Tahap Klinik

Pada tahap ini penurunan kadar hormon terus berlanjut yang meliputi melatonin, *growth hormon*, testosteron, estrogen dan juga hormon tiroid. Terjadi penurunan hormon hingga hilangnya kemampuan

penyerapan bahan makanan, vitamin dan mineral. Penyakit kronis menjadi lebih nyata dan sistem organ tubuh mulai mengalami kegagalan.

### 2.1.2 Teori Penuaan

Teori pokok dari *aging* terdiri dari 4 teori (Goldman dan Klatz, 2007), sebagai berikut :

1. Teori “*wear and tear*”

Teori ini mengemukakan bahwa tubuh dan sel mengalami kerusakan karena sering digunakan dan disalahgunakan (*overuse and abuse*). Kerusakan ini tidak terbatas pada organ melainkan juga terjadi pada tingkat sel.

2. Teori Neuroendokrin

Teori ini berdasarkan peranan berbagai hormon bagi fungsi organ tubuh. Pertambahan usia dapat menyebabkan penurunan produksi hormon pada organ tubuh yang berakibat terganggunya berbagai sistem tubuh suatu organisme.

3. Teori Kontrol Genetik

Teori ini berfokus pada genetik yang memprogram sandi sepanjang DNA. Setiap organisme mempunyai kode genetik yang unik dan berbeda, yang memungkinkan fungsi fisik dan mental tertentu. Penurunan genetik tersebut menentukan umur dan kecepatan proses penuaan pada setiap organisme.

#### 4. Teori Radikal Bebas

Teori ini menjelaskan bahwa penuaan terjadi karena akumulasi kerusakan oleh radikal bebas dalam sel terjadi sepanjang waktu. Radikal bebas merupakan suatu molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan. Radikal bebas memiliki sifat reaktivitas yang tinggi karena kecenderungan menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal karena hilangnya atau bertambahnya satu elektron pada molekul lain. Radikal bebas akan merusak molekul yang elektronnya ditarik oleh radikal bebas tersebut sehingga menyebabkan kerusakan sel, gangguan fungsi sel, hingga kematian sel. Molekul utama dalam tubuh yang dirusak oleh radikal bebas adalah DNA, lemak dan protein. Bertambahnya usia akan menyebabkan akumulasi kerusakan sel akibat radikal bebas, sehingga mengganggu metabolisme sel.

#### 2.2 Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*)

Pegagan merupakan tanaman liar yang banyak tumbuh di perkebunan, pematang sawah, tepi jalan dan di ladang. Pegagan tumbuh merayap menutupi tanah serta tidak memiliki batang tanaman. Pada **Gambar 2.1** menjelaskan tentang klasifikasi tanaman pegagan. Tanaman pegagan memiliki tinggi sekitar 10 cm hingga 50 cm. Pegagan memiliki daun satu helaian yang tersusun dalam roset akar dan terdiri dari 2 sampai 10 helai daun. Daunnya berwarna hijau dan berbentuk seperti kipas. Tangkai daun tanaman pegagan berbentuk seperti pelepah yang agak panjang dan berukuran 5 cm hingga 15 cm. Pada tangkai daunnya terdapat daun sisik yang sangat pendek, licin dan tidak berbulu.

Pegagan memiliki bunga putih atau merah muda yang tersusun dalam karangan yang berbentuk payung. Buah pegagan berbentuk lonjong atau pipih, rasanya pahit dan panjang buahnya 2 mm sampai 2,5 mm. Buah pegagan berdinding agak tebal, kulitnya keras, berlekuk dua dan berwarna kuning (Winarto dan Surbakti, 2003).



**Gambar 2.1.** Tanaman pegagan (*Centella asiatica*) (Solihati, 2013).

Berdasarkan deskripsi yang telah diuraikan, berikut adalah klasifikasi dari tanaman pegagan (Winarto dan Surbakti, 2003) :

Kingdom : Plantae  
Divisi : Spermatophyta  
Sub-divisi : Angiospermae  
Kelas : Dikotyledonae  
Ordo : Umbellales  
Famili : Umbelliferae  
Genus : *Centella*  
Spesies : *Centella asiatica*

### 1.2.1 Kandungan Tanaman Pegagan

Tanaman pegagan memiliki berbagai macam senyawa aktif yaitu triterpenoid, minyak esensial, flavonoid dan komponen lainnya seperti polisakarida, polyne-alkaline, asam amino, asam lemak, alkaloid, sterol, carotenoid, tannin, klorofil, garam inorganik, dll. Telah diketahui bahwa efek farmakologi utama dari pegagan diketahui berasal dari kandungan senyawa triterpenoid. Berikut adalah kandungan nutrisi dari tanaman pegagan pada

**Tabel 2.1** (Kormin, 2005) :

**Tabel 2.1.** Kandungan Nutrisi Pegagan

Tanaman Pegagan ( <i>Centella asiatica</i> )	% E.P	Komposisi nutrient per 100g sampel					
		Proximate komposisi					
		Kcl Energy	g Air	g Protein	g Lemak	g CHO	g Serat
		37	87,7	2	0,2	6,7	1,6
		Vitamin					
		µg Retinol	µg Karoten	µg RE	µg B1	µg B2	µg Niacin
		0	2649	442	0,09	0,19	0,1
		Mineral					
		mg Ca	mg P	mg Fe	mg Na	mg K	-
		171	32	5,6	21	391	-

### 1.2.2 Tanaman Pegagan sebagai Antioksidan

Tanaman pegagan telah lama dikenal memiliki antioksidan yang tinggi. Kandungan poliphenol ditemukan dalam tanaman pegagan mulai dari daun, akar dan batang. Kandungan poliphenol yang tinggi pada tanaman pegagan memiliki efek antiinflamasi dan antioksidan yang kuat. Kandungan flavonoid termasuk apigenin, kaemferol, quercetin dan juga didapatkan

menggunakan *Thin Layer Chromatography* (TLC). Flavonoid memiliki fungsi sebagai antioksidan primer, *chelators* dan *superoxide anion scavenger* serta memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat dalam melawan *peroxy radicals* dibandingkan dengan vitamin E dan vitamin C (Kormin, 2005). Kandungan flavonoid pada tanaman pegagan yaitu sebesar 13,69% yang telah di ekstrak menggunakan etanol 70% (Sugianto, dkk., 2013).

Mekanisme kerja ekstrak pegagan sebagai antioksidan dapat melalui 3 jalan yaitu : *superoxide free radical scavenging activity*, *inhibition of linoleic acid peroxidation and radical scavenging activity*. Pegagan juga dapat mencegah kerusakan oksidatif yang ada pada beberapa kelainan neurologis termasuk stroke, parkinson, dan alzheimer serta dapat memperbaiki keadaan neurological antioksidan yang berhubungan dengan penuaan (Sunarjo, 2012).

Yones (2006) menyatakan bahwa flavonoid merupakan hasil metabolisme sekunder polifenol. Flavonoid dapat mengambat aktivitas biologi diantaranya anti alergi, anti virus, dan peradangan. Sedangkan menurut Fatriyawan (2016) efek farmakologi, telah dihubungkan dengan sifat antioksidan yaitu dapat menekan bentuk spesies oksigen reaktif dengan menghambat enzim, mencegah spesies radikal bebas khususnya *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan melindungi sel dari antioksidan yang bersifat radikal. Antioksidan flavonoid berfungsi sebagai pencegahan radikal bebas dengan mendonorkan atom hidrogen 3'4'-dihidroksi pada cincin B yang merupakan target radikal bebas yang bermanfaat sebagai antioksidan.



Penurunan kadar MDA terjadi karena senyawa isoflavon (golongan flavonoid) mampu mencegah terjadinya peroksidasi lipid, meskipun belum mencukupi untuk melawan berlebihnya pembentukan radikal bebas. Menurut Suarsana (2009), isoflavon ekstrak etanol tanaman pegagan bekerja sinergis dengan enzim antioksidan intrasel sehingga aktivitas enzim antioksidan yang terdapat pada hepar dapat dipertahankan untuk tidak turun secara drastis. Fungsi flavonoid secara umum dalam menetralkan radikal bebas yang terbentuk di dalam tubuh melalui mekanisme kapasitas antioksidan dan stimulasi gen yang bertanggung jawab terhadap sintesis enzim antioksidan.

### 1.2.3 Tanaman Pegagan sebagai Profertilitas

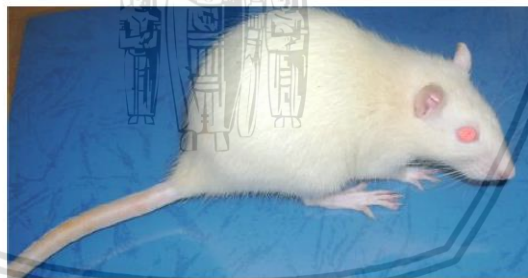
Pegagan merupakan salah satu tanaman obat yang sangat bermanfaat untuk kesehatan. Salah satu senyawa yang terdapat di dalam tanaman pegagan adalah madecocassosida yang bermanfaat dalam memicu produksi kolagen. Kolagen sangat bermanfaat dalam membantu merangsang regenerasi sel kulit. Selain itu, kolagen juga berfungsi meregenerasi sel telur pada betina dan sel sperma pada jantan. Kandungan karoten yang ada di dalam pegagan adalah antioksidan alami, selain itu, manfaat dari karoten juga meningkatkan kualitas sel telur dan sel sperma.

Menurut penelitian Lusiana dkk., (2013) bahwa selain kandungan triterpenoid yang mendominasi, ternyata tanaman pegagan juga mengandung fitosterol yang merupakan turunan senyawa sterol sebagai bahan baku pembentuk hormon seksual. Senyawa-senyawa fitosterol yang terdapat pada tumbuhan antara lain yaitu sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol. Senyawa

fitosterol dapat mempengaruhi sel leydig memproduksi testosteron. Hormon testosteron berfungsi untuk pematangan akhir spermatozoa. Selain mempengaruhi spermatogenesis, testosteron juga mengatur sifat-sifat seks sekunder, rangsangan seksual, perkembangan saluran-saluran kelamin dan kelenjar kelamin tambahan.

### 2.3 Hewan Coba Tikus

Hewan coba merupakan hewan yang digunakan sebagai hewan model guna mempelajari dan mengembangkan berbagai macam ilmu dalam skala penelitian dan pengamatan penelitian. Pada **Gambar 2.2**, menjelaskan ciri-ciri pada tikus putih, yaitu rambut berwarna putih, mata merah, panjang tubuh sepanjang 440 mm, panjang ekor mencapai 205 mm serta pada usia dewasa berat badannya berkisar sekitar 100-105 gram (Akbar, 2010).



**Gambar 2.2.** Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Akbar, 2010).

Tikus *Sparague Dawley* merupakan jenis tikus albino serbaguna digunakan secara ekstensif dalam riset medis. Keuntungan utamanya adalah ketenangan dan kemudahan penanganannya. Berat badan dewasa yaitu 250 g sampai 300 g untuk betina, sedangkan pada tikus jantan memiliki ukuran

sekitar 450 g sampai 520 g. Tikus ini biasanya memiliki ekor untuk meningkatkan rasio panjang tubuh (Solihati, 2013).

Berikut klasifikasi tikus *Rattus novergicus* menurut Myers and Armitage (2004) :

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mammalia

Ordo : Rodentia

Subordo : Myomorpha

Famili : Muridae

Genus : *Rattus*

Spesies : *Rattus novergicus*

Data biologi tikus putih (*Rattus novergicus*) disajikan pada **Tabel 2.2** sebagai berikut :

**Tabel 2.2.** Data biologi tikus

No	Kondisi Biologi	Jumlah
1	Berat Badan	
	Jantan	300-400 gr
	Betina	250-300 gr
2	Lama hidup	2,5-3 tahun
3	Temperatur tubuh	37,5°C
4	Kebutuhan air	8-11 mL/100 gr BB
	Kebutuhan makanan	5 gr/100 gr BB
5	Umur dewasa	50-60 hari
6	Volume darah	57-70 hari
7	Tekanan darah	
	Sistolik	84-174 mmHg
	Diastolik	58-145 mmHg
8	Frekuensi jantung	330-480 / menit
9	Frekuensi respirasi	66-114 / menit
10	Tidal volume	0,6 – 1,25 mm

(Kusumawati, 2004).

Berat badan tikus jantan dewasa 300-400 gram dan tikus betina dewasa 250-300 gram. Waktu dewasa seksual tikus kurang lebih 60 hari, dan usia maksimum tikus adalah 1-2 tahun. Masa kebuntingan tikus yaitu 19-21 hari dan jumlah anak yang dilahirkan berkisar antara 6-15 ekor. Tikus jantan dan betina dapat dibedakan dengan mudah, yaitu dengan mengamati alat kelaminnya. Betina memiliki jarak yang pendek antara anus dan lubang genital eksternalnya. Tikus jantan lebih agresif dengan perawakan yang lebih besar dari tikus betina. Hewan ini memiliki karakter yang lebih aktif pada malam hari daripada siang hari (Sunarjo, 2012).

Tikus putih yang digunakan untuk percobaan laboratorium yang dikenal ada tiga macam jalur galur yaitu *Sparague Dawley*, *Long Evans* dan *Wistar*. Tikus *Rattus novergicus* digunakan dalam setiap penelitian karena memiliki keunggulan berupa asam amino, sistem metabolisme dan organnya hampir sama dengan manusia sehingga memudahkan dalam penelitian, perkembangannya cepat dan mudah dipelihara dalam jumlah yang banyak (Akbar, 2010).

### 2.3.1 Konversi Umur Tikus

Dalam suatu penelitian yang membutuhkan hewan uji di dalamnya, diperlukan suatu data konversi dosis untuk mengetahui dosis yang penyetaraan dari manusia ke hewan uji dan sebaliknya. Bila dibandingkan dengan manusia, tikus mempunyai waktu hidup yang singkat dan pertumbuhan yang sangat pesat pada masa mudanya. Tikus berkembang pesat pada masa muda dan mulai

matang saat umur 6 minggu. Berbeda dengan manusia yang mempunyai pertumbuhan yang lambat dan pubertas pada kisaran umur 12 sampai 13 tahun.

Pada masa dewasa setiap bulan umur tikus setara dengan 2,5 tahun umur manusia. Tikus yang digunakan sebagai hewan uji memiliki usia sekitar 2 tahun sedangkan ekspektasi waktu hidup pada manusia yaitu sekitar 60 tahun (Andreollo *et al.*, 2012). Hubungan antara umur tikus dalam bulan dan umur manusia dalam tahun pada fase dewasa dalam **Tabel 2.3** sebagai berikut :

**Tabel 2.3.** Hubungan Antara Umur Tikus dan Umur Manusia

Umur Tikus (bulan)	Umur Manusia (tahun)
6	18
12	30
18	45
24	60
30	75
36	90
42	105
45	113
48	120

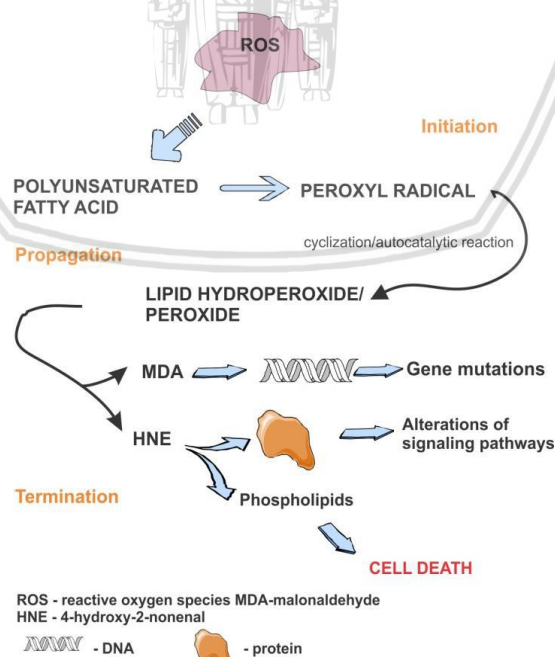
(Andreollo *et al.*, 2012).

## 2.4 Malondialdehida (MDA)

*Malondialdehida* adalah senyawa *dialdehida* yang merupakan produk akhir peroksidasi lemak tak jenuh dalam tubuh oleh radikal bebas. Peroksidasi lipid telah diketahui sebagai mekanisme dari kerusakan sel dan merupakan indikator adanya stres oksidatif pada sel dan jaringan. Stress oksidatif adalah peristiwa saat radikal bebas berupa molekul reaktif yang muncul melalui suatu reaksi biokimiawi dari sel normal merusak membran sel dan menimbulkan gangguan fungsi tubuh (Adji, 2008). Tingginya kadar MDA dalam plasma

merupakan ukuran dimana terjadi peningkatan radikal bebas dan penurunan antioksidan dalam tubuh. MDA bersifat toksin terhadap sel dan dapat menimbulkan perubahan pada DNA bahkan sampai oksidasi lesi mutagenik (Fatimah dkk, 2014).

Suatu keadaan dimana terdapat molekul yang mempunyai elektron tidak berpasangan dikenal sebagai radikal bebas. Elektron yang tidak mempunyai pasangan akan mencari elektron lain untuk dijadikan pasangan. Oleh sebab itu radikal bebas akan menyerang molekul terdekat untuk mendapatkan elektron. Dengan demikian radikal bebas akan menyebabkan kehancuran molekul lain. Apabila menimpa DNA, radikal bebas menyebabkan mutasi-mutasi yang dapat memicu sel-sel berlaku menyimpang. Kerusakan secara terus-menerus oleh radikal bebas akan menyebabkan penuaan atau degenerasi (Fatimah dkk, 2014).



**Gambar 2.3.** Mekanisme Lipid Peroksidasi (Coricovac, 2014).



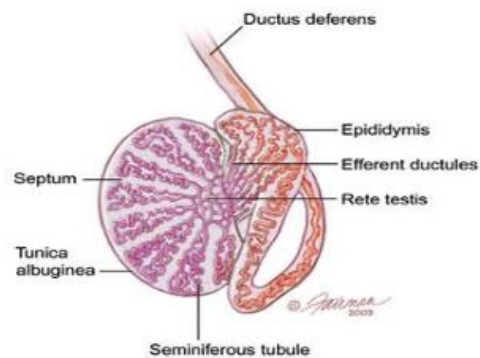
Keadaan stress oksidatif biasanya terjadi bila jumlah radikal bebas dalam tubuh lebih tinggi dari jumlah sistem antioksidan. Stress oksidatif yang ditimbulkan oleh radikal bebas tersebut dapat ditentukan dengan mengukur salah satu parameter berupa *malondialdehyde* (MDA). Bila kadar MDA tinggi dalam plasma, maka dapat dipastikan sel mengalami stres oksidatif. *Malondialdehyde* (MDA) terbentuk dari asam lemak tidak jenuh (PUFA) yang mengalami proses peroksidasi menjadi peroksida lipid yang kemudian mengalami dekomposisi (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Kerusakan pada testis berdampak pada kapasitas epitel germinativum dalam memproduksi spermatozoa dan proses steroidogenesis sel leydig dan stres oksidatif pada testis merusak fungsi reproduksi pria (Aitken dan Roman, 2008). Menurut Sikka (2014) menunjukkan bahwa 50% kasus infertilitas pria ditemukan radikal bebas dalam konsentrasi tinggi. Penuaan atau *aging* memicu peningkatan stres oksidatif dan merangsang pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam jumlah tinggi. Peningkatan kadar ROS mengaktifasi peroksidasi lipid dan menyebabkan kerusakan sel dan jaringan. Hasil akhir peroksidasi lipid yaitu senyawa hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) berupa *malondialdehida* (MDA), oksidan dalam tubuh yang memiliki sifat sitotoksik (Ayala *et al.*, 2014). Perhitungan ekspresi MDA dipakai sebagai biomarker untuk menilai derajat stres oksidatif. Ekspresi MDA pada sel sertoli digunakan untuk menggambarkan kerusakan jaringan testis (Takashi *et al.*, 2011).

## 2.5 Testis

Testis merupakan kelenjar ganda karena secara fungsional testis bersifat eksokrin dan endokrin. Testis bersifat eksokrin atau reproduksi karena menghasilkan sel kelamin atau spermatozoa. Testis juga bersifat endokrin atau hormonal karena menghasilkan hormon androgen (Setyaningsih, 2011). Testis merupakan organ berbentuk oval dan berjumlah dua buah yang berukuran sama besar. Testis manusia dewasa memiliki panjang antara 4,1 cm hingga 5,2 cm dan lebar 2,5 cm hingga 3,3 cm. Sedangkan testis tikus dewasa memiliki panjang rerata 4,6 cm dengan diameter 2,6 cm. Testis semua jenis spesies berkembang di dekat ginjal. Pada mamalia, testis berada dalam kantong skrotum yang terletak di luar abdomen. Kantong tersebut mengandung sel-sel otot yang mampu berkontraksi. Fungsi utama skrotum adalah untuk memberikan lingkungan yang lebih dingin dibanding dengan temperatur rongga tubuh yaitu sekitar 13,3°C hingga 17,2°C (Setyaningsih, 2011).

Menurut Leeson, dkk. (2006), testis terdiri dari tiga lapisan yaitu tunika vaginalis, tunika albugenia, dan tunika vaskulosa. Dapat dilihat pada **Gambar 2.4** merupakan gambaran anatomis dari testis. Tunika vaginalis merupakan lapisan terluar yang menutupi permukaan lateral dan anterior testis. Lapisan tersebut terletak diatas lamina basalis yang memisahkannya dengan tunika albugenia. Tunika albugenia menebal pada permukaan posterior testis dan menjorok masuk ke dalam testis sebagai mediastinum testis atau lapisan tengah. Tunika vaskulosa merupakan lapisan terdalam yang terbenam di dalam jaringan ikat karang.



**Gambar 2.4.** Anatomi testis (Faranita, 2009).

Testis memiliki dua fungsi yaitu untuk memproduksi hormon androgen, testosteron dan dihidrotestosteron serta untuk memproduksi spermatozoa. Spermatozoa dibentuk dari sel germinal primitif di sepanjang dinding tubulus seminiferus dalam proses yang disebut spermatogenesis. Di dalam tubulus seminiferus juga terdapat sel sertoli yang memiliki fungsi membantu germinal dalam memelihara suasana agar sel tersebut dapat berkembang dan menjadi dewasa, mengirimkan sinyal untuk memulai spermatogenesis dan mempertahankan perkembangan spermatid, mengatur fungsi kelenjar pituitari sekaligus mengontrol spermatogenesis. Di antara tubulus seminiferus terdapat sel leydig yang memproduksi testosteron dan dihidrotestosteron yang kemudian akan disekresikan ke dalam aliran darah. Tubulus-tubulus seminiferus tersebut akan bergabung membentuk duktus yang lebih besar yang disebut tubulus rektus. Tubulus yang lebih besar ini membentuk rete testis yang akan berakhir pada duktus eferen. Dalam tubulus-tubulus tersebut mengalir cairan seminalis yang mengandung sperma dari testis ke epididimis. Dari sini spermatozoa memasuki vas deferens lalu duktus ejakulatorius untuk menuju ke urethra (Faranita, 2009).

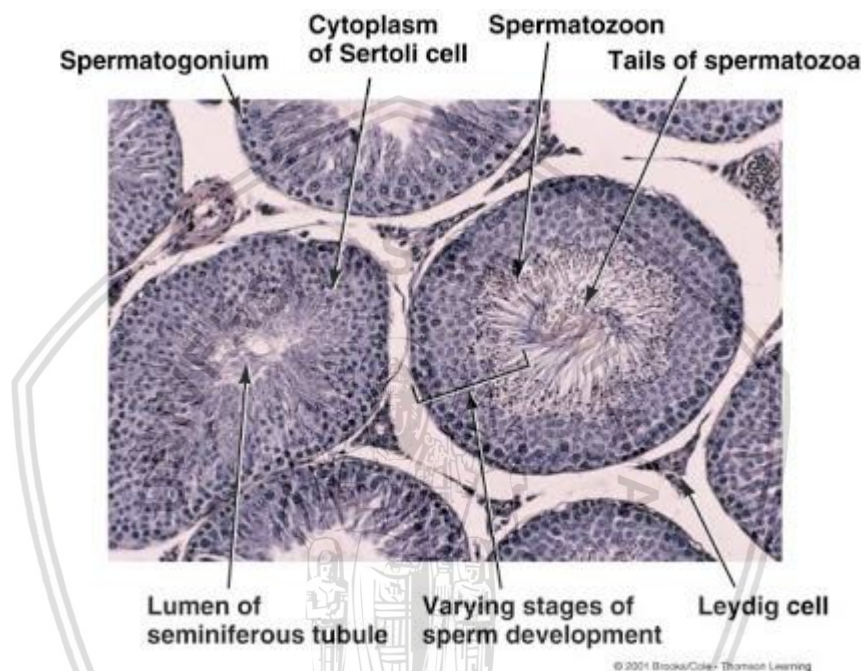
Testis adalah organ reproduksi jantan yang terutama bertanggung jawab untuk produksi spermatozoa melalui spermatogenesis dan produksi hormon androgen melalui steroidogenesis. Produksi spermatozoa terjadi di tubuli seminiferus testis yang dikontrol oleh testosteron yang dihasilkan oleh sel-sel leydig (interstitial) testis. Produksi testosteron secara langsung tergantung pada konsentrasi atau aktivitas *Luteinizing Hormon* (LH) yang disekresikan oleh kelenjar pituitary anterior. *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dilepaskan juga oleh hipofisa anterior, merangsang sel-sel sertoli yang memberikan nutrisi untuk perkembangan spermatozoa (Dolores dan Cheng, 2004).

Testis sebagai tempat berlangsungnya spermatogenesis bersifat sangat rentan terhadap proses oksidasi oleh radikal bebas. Radikal bebas ini akan menimbulkan gangguan pada spermatogenesis dan membran spermatozoa. Membran sel spermatogenik mengandung sejumlah besar asam lemak tak jenuh rantai ganda. Bila radikal bebas yang terbentuk bertemu dengan asam lemak tak jenuh ganda dalam membran sel, akan terjadi reaksi peroksidasi lipid dari membran sel tersebut mengakibatkan peningkatan fluiditas membran, gangguan integritas membran dan inaktivasi ikatan membran dengan enzim dan reseptor. Hal ini akan menyebabkan peningkatan kerusakan sel termasuk spermatozoa (Sukmaningsih dkk., 2011).

### 2.5.1 Sel Sertoli

Sel lain yang berada di dalam tubulus seminiferus adalah sel sertoli. Sel sertoli berbentuk bulat atau segitiga dan letaknya di membran basal tubulus

seminiferus diantara spermatogonia. Ciri dari sel sertoli yaitu mempunyai penjurusan ke arah lumen tubulus seminiferus. Jumlah sel ini bervariasi antara 5 sampai 10 sel dalam setiap tubulus seminiferus. Fungsi sel ini adalah sebagai sel pendukung yang memberi nutrisi, proteksi dan menunjang sel-sel spermatogenik (Mughniati, 2015).

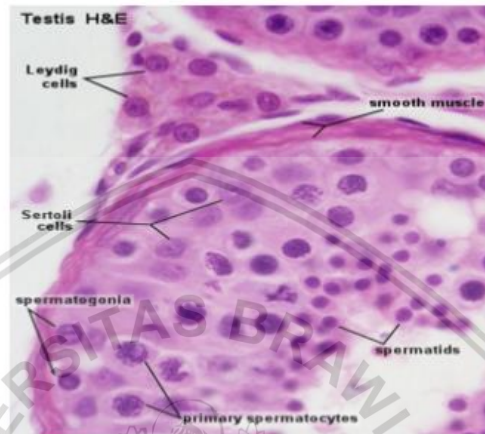


**Gambar 2.5.** Histologi Tubulus Seminiferus normal (Welsh *et al*, 2008).

Sel sertoli adalah sel pyramid memanjang yang sebagian memeluk sel-sel dari garis keturunan spermatogenik. Dasar sel sertoli melekat pada lamina basalis, sedangkan ujung apeksnya sering meluas ke dalam lumen tubulus seminiferus. Dengan mikroskop cahaya, bentuk sel sertoli tidak jelas terlihat karena banyaknya juluran lateral yang mengelilingi sel spermatogenik. Kajian dengan mikroskop elektron mengungkapkan bahwa sel ini mengandung banyak retikulum endoplasma licin, sedikit retikulum endoplasma kasar, sebuah kompleks golgi yang berkembang baik, banyak mitokondria dan



lisosom. Inti yang memanjang sering berbentuk segitiga, memiliki banyak lipatan dan sebuah anak inti yang mencolok, serta memiliki sedikit heterokromatin (Junquiera dkk., 2007). Morfologi sel sertoli dapat dilihat pada **Gambar 2.6** sebagai berikut :



**Gambar 2.6.** Penampang histologi sel Leydig dan sel Sertoli (Hill, 2011).

Selain sel spermatozoa pada testis, juga terdapat sel sertoli. Sel sertoli ini memiliki bentuk piramida, inti polimorf dan pucat, melekat pada lamina basalis, sedangkan bagian ujungnya menjorok ke dalam lumen tubulus seminiferus. Sel-sel sertoli tersebut memiliki fungsi sebagai berikut (Afifatunnisa dkk., 2013) :

1. Sebagai sawar darah-testis, yaitu untuk mencegah bahan-bahan yang terdapat di dalam darah kemudian masuk ke dalam lumen tubulus, sehingga hanya molekul-molekul tertentu yang mampu melewati sel sertoli yang dapat mencapai cairan lumen. Selain itu juga dapat mencegah sel-sel penghasil antibodi di cairan ekstra sel mencapai lumen tubulus penghasil spermatozoa, hal ini bertujuan untuk mencegah pembentukan antibodi terhadap spermatozoa.

2. Sel sertoli sebagai penyokong, pelindung dan pengatur yang sedang berkembang.
3. Sel sertoli berperan untuk fagositosis. Selama spermatogenesis, sitoplasma spermatid yang berlebihan dibuang sebagai badan-badan residu. Fragmen sitoplasma ini difagosit, dihancurkan dan selanjutnya direabsorpsi oleh lisosom sel sertoli.
4. Sel sertoli mengsekresikan ke dalam tubulus seminiferus cairan yang mengalir ke arah duktus genitalis dan digunakan untuk transport spermatozoa. Selain itu sel sertoli menghasilkan protein pengikat androgen ABP (*Androgen Binding Protein*). Protein tersebut mengikat androgen (yaitu testosteron) sehingga kadar hormon ini di dalam tubulus seminiferus tetap tinggi.
5. Sel sertoli adalah tempat kerja testosteron dan *Folicle Stimulating Hormon* (FSH) untuk mengontrol spermatogenesis.

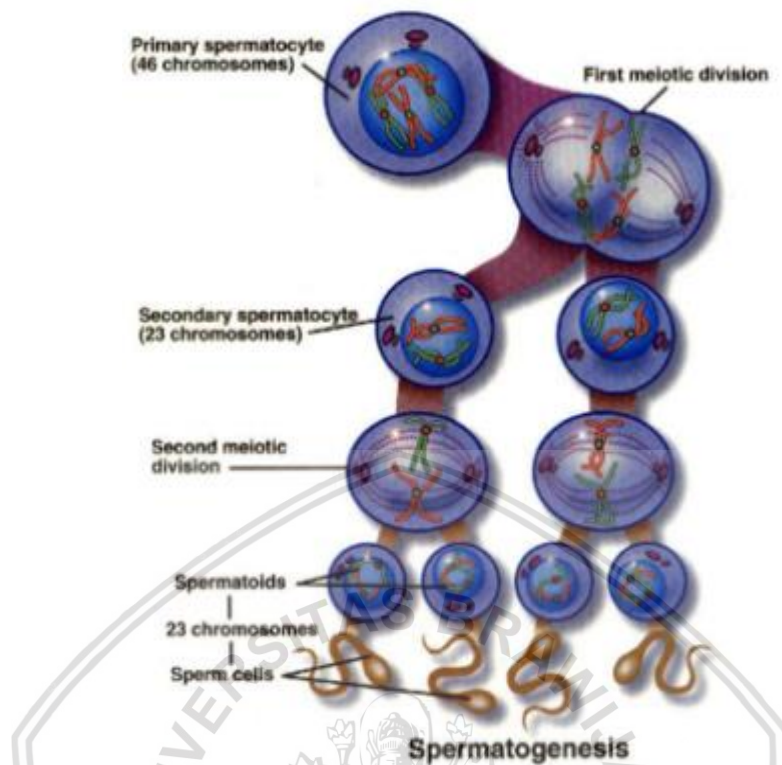
## 2.6 Spermatogenesis

Spermatozoa atau spermatozoon atau sering juga disebut dengan *sperm cell* merupakan sel haploid (n) yang dibentuk di dalam tubulus seminiferus dari gamet jantan melalui proses yang kompleks yang disebut spermatogenesis. Spermatozoa merupakan hasil perkembangan dari sel germinal yang berada di testis, dikeluarkan dari tubuh organisme jantan dalam bentuk semen (spermatozoa dan plasma semen). Spermatogenesis adalah proses pembelahan dan perkembangan spermatogonia (*germ cell*) membentuk spermatozoa yang terjadi di dalam tubulus seminiferus testis. Sel germinal



merupakan sel induk dari sel spermatogenik. Keberadaan sel germinal diatur secara regular yang terletak di bagian dasar tubulus seminiferus (spermatogonia) yang akan berkembang menjadi spermatosit, semua semua terletak di lapisan epitel spermatogenik dalam tubulus seminiferus. Proses spermatogenesis dibagi menjadi dua tahap, yaitu spermatositogenesis dan spermiogenesis. Spermatositogenesis merupakan rangkaian perubahan spermatogonia menjadi spermatid. Spermatogonia merupakan sel bakal spermatozoa, terletak pada membran basal epitel tubulus seminiferus, dengan ciri-ciri vesikular dengan membran inti yang jelas. Spermatogonia memperbanyak diri (proliferasi) secara kontinyu melalui proses mitosis, menghasilkan spermatogonia dalam jumlah besar.

Menurut Akmal dkk., (2016) beberapa spermatogonia berhenti berproliferasi, kemudian mengalami differensiasi dan membelah secara mitosis menjadi spermatosit primer. Setiap spermatosit primer bergerak ke arah dalam dari epitel spermatogenik dalam tubulus seminiferus. Sel ini mengandung kromosom diploid berkembang menjadi sel yang berukuran paling besar dari seluruh sel spermatogenik. Selanjutnya, terjadi duplikasi DNA dan mengalami pembelahan meiosis I sehingga menghasilkan spermatosit sekunder. Pada pembelahan ini menghasilkan variasi genetik, seperti pemisahan secara random kromosom induk dan *crossover* kromosom, meningkatnya variasi genetik gamet. Kemudian spermatosit sekunder membelah lagi melalui proses meiosis II untuk menghasilkan empat sel spermatid yang mengandung kromosom haploid (Hayati, 2010).



**Gambar 2.7.** Proses Spermatogenesis (Constantinescu, 2007).

Faktor-faktor yang mempengaruhi spermatogenesis dapat dikelompokkan menjadi dua bagian yakni:

a. Faktor endogen

Faktor endogen ialah endokrin, psikologis dan genetik. Selain hormon stroid, terdapat juga senyawa lain yang disekresikan oleh testis yaitu inhibin. Inhibin ini dihasilkan oleh sel Sertoli dan mempunyai fungsi menekan hipofisis untuk mensekresi gonadotropin (Janqueira, 2007). Penelitian ini menunjukkan bahwa 30% spermatogenesis pada manusia disebabkan oleh faktor genetik yang secara fenotip dihubungkan dengan azoosperma dan oligospermia idiopatik yang berat (Widayati, 2008).

b. Faktor eksogen

Faktor eksogen meliputi faktor fisik, dan bahan kimia dan obat-obatan. Malnutrisi, alkoholisme, dan kerja obat tertentu (seperti busulfan) dapat mengakibatkan gangguan pada spermatogonia yang kemudian menyebabkan penurunan produksi spermatozoa. Radiasi sinar-X dan garam Cadmium cukup toksik terhadap sel turunan spermatogenik (Janqueira, 2007).

### 2.6.1 Peran Hormon pada Spermatogenesis

Proses spermatogenesis dipengaruhi oleh hormon-hormon yang dihasilkan oleh organ hipotalamus, hipofisis dan testis sendiri. Testis memproduksi sejumlah hormon jantan yang keseluruhan disebut androgen. Yang paling poten dari androgen adalah testosteron. Fungsi dari testosteron adalah merangsang pendewasaan spermatozoa yang terbentuk dalam tubulus seminiferus, merangsang pertumbuhan kelenjar-kelenjar asesori dan merangsang sifat jantan (Hutasuhut, 2014).

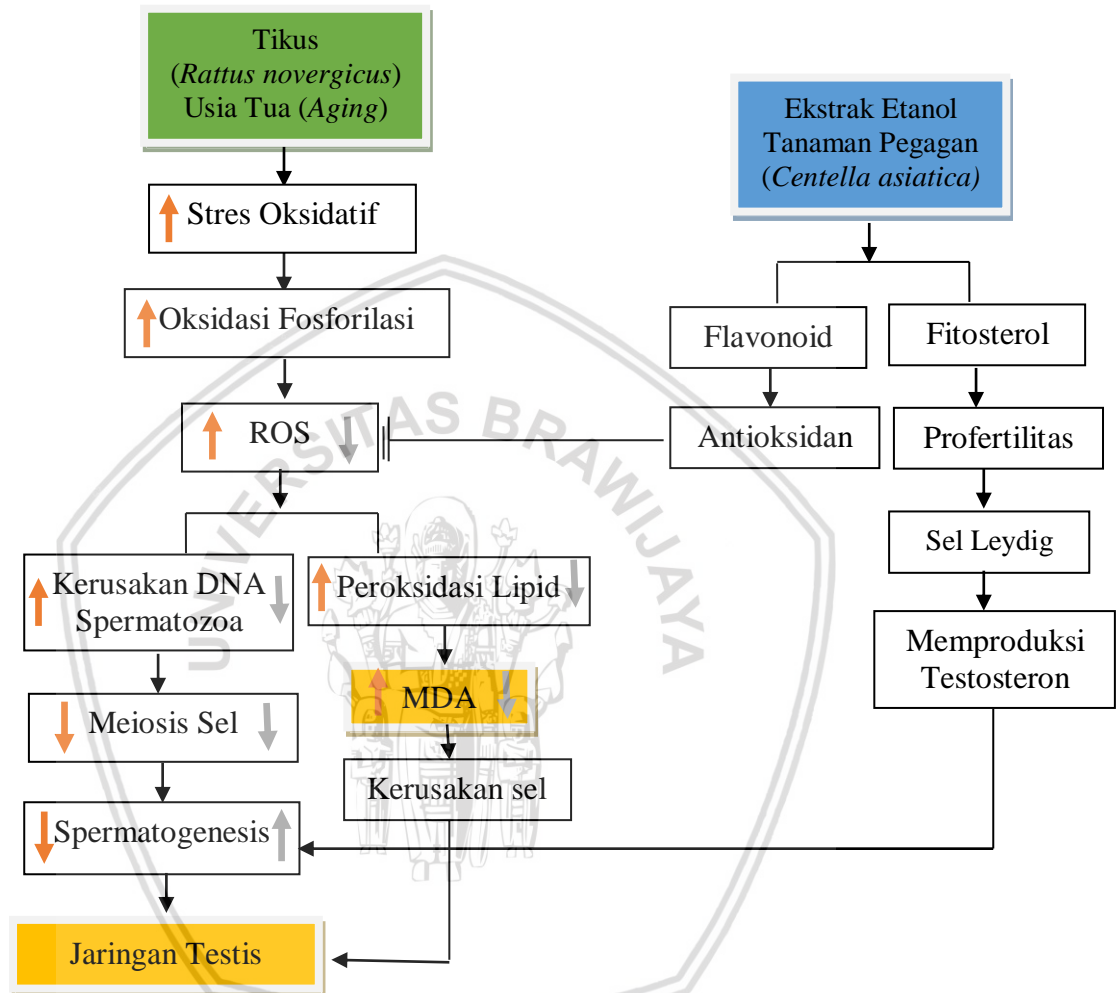
Spermatogenesis dan pematangan sperma sewaktu bergerak di sepanjang epididimis dan vas deferens memerlukan hormon androgen. Androgen juga mengontrol pertumbuhan dan fungsi vesikula seminalis serta kelenjar prostat. Spermatogenesis hampir seluruhnya terjadi di bawah pengaruh hormon-hormon yang berasal dari hipofisa, terutama FSH. Spermiogenesis adalah lanjutan spermatogenesis yang berlangsung di bawah peranan LH dan testosteron. Tanpa testosteron, spermatozoa tidak dapat mencapai pendewasaan yang terbaik.

Aksi FSH pada spermatogenesis diduga diperantarai oleh sel sertoli, karena hormon peptida tidak dapat secara langsung mencapai spermatosit dan spermatid karena barier darah testis yang terbentuk selama 16-19 hari setelah dilahirkan. Adanya reseptor androgen pada sel germinal masih kontroversial, sementara ini reseptor tersebut telah ditemukan dalam sel leydig, sel peritubular, sel sertoli dan lapisan otot pembuluh darah pada sebagian arteri dalam testis tikus. Hal ini menunjukkan bahwa peran testosteron pada spermatogenesis adalah pada mediasi terakhir. Salah satu peran sel sertoli adalah memproduksi protein-pengikat androgen, yang dirangsang oleh FSH dan testosteron (Krinke, 2000).



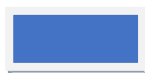
## BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 1.1 Kerangka Konseptual



**Gambar 3.1.** Kerangka konsep penelitian.

Keterangan :



: Variabel bebas



: Variabel Kendali



: Variabel bergantung



: Kondisi tikus tua (*aging*)



: Efek pemberian *Centella asiatica*

Tikus (*Rattus novergicus*) yang digunakan merupakan galur SD usia tua yaitu sekitar 2 tahun. Menurut Wardani (2010), sel spermatozoa akan mengalami kerusakan diakibatkan stress oksidasi yang tinggi karena proses penuaan (*aging*). Stress oksidasi dapat menyebabkan gangguan pada proses oksidasi disforforilasi, sehingga dapat meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) spermatozoa. Jumlah ROS berlebih yang diproduksi oleh leukosit dan spermatozoa normal dengan menginduksi lipid peroksidasi dan kerusakan DNA spermatozoa, sehingga dapat mengganggu proses pembelahan dan reproduksi sel. Tingginya kadar ROS memicu terjadinya peroksidasi lipid. Oksidasi lipid (*lipid peroksidase*) pada membran spermatozoa menghasilkan senyawa malondialdehida (MDA). Senyawa MDA dapat mengakibatkan kerusakan membran, yang dapat dilihat dari kematian sel (apoptosis). Sel spermatogenik yang mengalami apoptosis akan diserap oleh sel sertoli sehingga mempengaruhi jumlah spermatozoa. Sel leydig terdapat diantara tubulus seminiferus yang berfungsi untuk memproduksi testosteron. Penurunan jumlah dan aktivitas sel leydig dapat menyebabkan sperma berkurang hingga 50% dan testosteron juga mengalami penurunan.

Ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) diberikan pada tikus usia tua melalui sonde peroral. Tanaman pegagan diduga memiliki kandungan flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan untuk menurunkan kadar MDA (Malondialdehida). Peroksidasi lipid (*lipid peroksidase*) pada membran spermatozoa menghasilkan senyawa *malondialdehyde* (MDA), yang bersifat toksik pada sel sehingga dapat menyebabkan kerusakan membran

spermatozoa. Membran spermatozoa yang rusak akan menyebabkan penurunan integritas membran spermatozoa, sehingga pada akhirnya menyebabkan penurunan kualitas sperma. Peroksidasi lipid dapat merusak struktur lipid membran spermatozoa, hal ini terkait dengan kehilangan pergerakan dan penurunan spermatogenesis (Hayati, 2006). Penurunan kadar MDA terjadi karena senyawa isoflavon (golongan flavonoid) mampu mencegah terjadinya peroksidasi lipid, meskipun belum mencukupi untuk melawan berlebihnya pembentukan radikal bebas. Isoflavon ekstrak etanol tanaman pegagan bekerja sinergis dengan enzim antioksidan intrasel sehingga aktivitas enzim antioksidan yang terdapat pada testis dapat dipertahankan untuk tidak turun secara drastis.

Selain itu, tanaman pegagan memiliki kandungan fitosterol. Sterol yang terdapat pada tumbuhan dikenal sebagai fitosterol, sedangkan pada hewan disebut estrogen (Lusiana dkk., 2013). Senyawa fitosterol berguna untuk profertilitas sehingga dapat meningkatkan jumlah sel-sel spermatogonia selama proses spermatogenesis. Senyawa fitosterol juga berfungsi sebagai profertilitas yaitu mempengaruhi sel leydig memproduksi testosteron. Hormon testosteron berfungsi untuk pematang akhir spermatozoa. Sehingga pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan dapat meningkatkan produksi spermatozoa.



### 3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep yang telah diuraikan didapatkan hipotesa penelitian sebagai berikut :

1. Pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* menurunkan ekspresi MDA sel spermatogenik pada tikus putih (*Rattus novergicus*) usia tua.
2. Pemberian ekstrak etanol *Centella asiatica* mengurangi kerusakan sel-sel spermatogenik selama proses spermatogenesis jaringan testis pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua.



## BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni 2017 hingga bulan Oktober 2017. Dengan uraian tempat pelaksanaan penelitian sebagai berikut :

- a. Proses ekstraksi *Centella asiatica* dilakukan di Materia Medica, Batu.
- b. Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- c. Koleksi jaringan testis untuk pemeriksaan sampel dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- d. Pembuatan preparat histopatologi testis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- e. Pengamatan preparat histopatologi testis dengan metode imunohistokimia dan analisis ekspresi MDA dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

### 4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus novergicus*) yang terdiri dari 5 kelompok perlakuan. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008) :

$$\begin{aligned}
 t(n-1) &\geq 15 \\
 5(n-1) &\geq 15 \\
 5n-5 &\geq 15 \\
 5n &\geq 20 \\
 n &\geq 4
 \end{aligned}$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan diatas maka untuk empat kelompok hewan coba diperlukan jumlah ulangan paling sedikit lima ekor dalam setiap kelompok sehingga dibutuhkan 25 ekor hewan coba.

### 4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental *post test control design only* menggunakan model RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan membagi hewan coba menjadi 5 kelompok, yaitu kelompok KN (kontrol negatif), kelompok KP (kontrol positif), kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok perlakuan 3 (P3) pada **Tabel 4.1** :

**Tabel 4.1.** Kelompok Perlakuan pada Penelitian

Kelompok	Keterangan
Kontrol Negatif	Kontrol tikus muda yang hanya diberikan pakan dan minum <i>ad libitum</i> selama 21 hari tanpa diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i>
Kontrol Positif	Kontrol tikus tua yang hanya diberikan pakan dan minum <i>ad libitum</i> selama 21 hari tanpa diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i>
Perlakuan 1	Tikus tua diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i> dengan volume pemberian 1 mL selama 21 hari dengan dosis 100mg/kg BB
Perlakuan 2	Tikus tua diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i> dengan volume pemberian 1 mL selama 21 hari dengan dosis 200mg/kg BB
Perlakuan 3	Tikus tua diberikan ekstrak <i>Centella asiatica</i> dengan volume pemberian 1 mL selama 21 hari dengan dosis 300mg/kg BB dan dilakukan pembedahan pada hari ke 22

#### 4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati pada penelitian ini yaitu :

Variabel bebas : Ekstrak *Centella asiatica*

Variabel tergantung : Histopatologi testis dan ekspresi MDA

Variabel kendali : Homogenitas tikus SD (jantan, berat badan dan umur), homogenitas pakan (komposisi ransum pakan disusun berdasarkan standar AOAC yaitu mengandung karbohidrat, protein, lemak, mineral, vitamin, dan air), homogenitas kandang (ukuran, suhu, dan kandang).

#### 4.5 Materi Penelitian

##### 4.5.1 Alat

Alat yang dipakai dalam penelitian ini yaitu bak pemeliharaan hewan coba, tempat makan dan minum tikus, box paparan, sonde, seperangkat alat bedah, cawan petri, gelas objek, pot sampel, refrigerator, tabung reaksi, sentrifugator, pipet tetes, gelas ukur, maserator, rotary evaporator, vacuum drying, mikrotom, centellan, cover glass, dan mikroskop cahaya.

##### 4.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Centella asiatica*, alkohol, NaCl fisiologis, aquades, serbuk simplisia, etanol 70%, letichin, ekstrak pegagan, aqua bebas CO<sub>2</sub>, PFA 4%, alkohol (70%, 80%, 90%, 95%), xylol, PBS, antibodi MDA, antibodi sekunder universal dan Pewarna histopatologi Hematoxylin-Eosin.

## 4.6 Tahapan Penelitian

### 4.6.1 Preparasi Hewan Coba

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) strain SD (*Sparague Dawley*) umur 2 tahun berjenis kelamin jantan hasil perkembangbiakan yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran UB dengan bobot badan awal berkisar 300 gram. Kandang yang digunakan berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm. Suhu ruangan diatur pada 22-24°C dengan kelembapan udara 60%-70%. Ransum diberikan sebanyak 20 g per ekor per hari. Air minum diberikan *ad libitum*. Setiap 3 hari dilakukan penimbangan bobot badan per tikus dan pembersihan kandang. Adaptasi tikus terhadap lingkungan selama 7 hari dilakukan pada awal penelitian dengan pemberian ransum yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan lainnya. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi (Pratama, 2013).

### 4.6.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan (*Cetella asiatica*)

Phytosome ekstrak tanaman pegagan pada penelitian ini dibuat dengan cara membentuk ekstrak terlebih dahulu. Sebanyak 400 mg serbuk simplisia ditambahkan 500 mL etanol 70%, dicampur dalam maserator dengan pengadukan pelan selama 30 menit pada awal perendaman. Campuran disimpan selama 24 jam dengan sering dilakukan proses remaserasi. Filtrat disaring dan diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu sebesar 30°C dan di *vacum drying* untuk menghilangkan kadar air (Adianingsih *et al.*, 2013; Pramono & Ajiastuti, 2004).

Ekstrak tanaman pegagan kemudian dibuat bentuk phytosome dengan metode sonikasi (mencampur letichin, etanol 70%, ekstrak tanaman pegagan) lalu distirer  $\pm 3$  jam dengan *magnetig striter* 2000rpm. Dilakukan penguapan pelarut dengan *rotary evaporator* kemudian dihidrasi dengan aqua bebas CO<sub>2</sub> (Acharya, 2011; Adianingsih *et al.*, 2013).

#### 4.6.3 Pemberian Ekstrak Etanol Pegagan (*Cetella asiatica*) pada Hewan Coba

Ekstrak etanol tanaman pegagan diberikan dengan dosis bertingkat sesuai Gohil *et al* (2010), 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, dan 300 mg/kg BB sesuai masing-masing kelompok perlakuan. Pemberian dilakukan secara per oral menggunakan sonde lambung selama 21 hari. Setiap tikus putih (*Rattus novergicus*) disonde dengan ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) sebanyak 1 mL, perhitungan volume pemberian dapat dilihat pada (Lampiran 3).

#### 4.6.4 Pengambilan Sampel Organ Testis

Pengambilan organ testis dilakukan pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan 1 dosis 100 mg/kg BB, perlakuan 2 dosis 200 mg/kg BB, dan perlakuan 3 dosis 300 mg/kg BB dilakukan pada hari ke 22 setelah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan. Pada akhir penelitian yaitu pada hari ke-22 dilakukan *euthanasi* dengan cara dislokasio leher kemudian tikus diletakkan dengan posisi rebah dorsal pada papan pembedahan. Pembedahan dilakukan dengan membuka muskulus sepanjang abdomen sampai bawah dagu kemudian testis diambil dari scrotum di daerah prepubis dilanjutkan dengan

memotong testis kemudian diisolasi. Organ testis lalu dibilas dengan NaCl fisiologis pada cawan petri dan direndam. Kemudian organ testis dimasukkan dalam larutan paraformaldehide (PFA) 4% (Irawan dkk., 2012).

#### 4.6.5 Pembuatan Preparat Histopatologi Jaringan Testis

Setelah hewan dinekropsi kemudian organ testis diambil lalu dicuci dengan 0,9% NaCl fisiologis, dimasukkan ke dalam larutan formaldehide (PFA) 4% selama 24 jam. Setelah testis terfiksasi, larutan diganti dengan alkohol 70% yang dikenal sebagai “*stopping point*” dengan pengertian jaringan dapat disimpan lama pada larutan ini. Proses penarikan air dari jaringan (dehidrasi) dilakukan menggunakan alkohol dengan konsentrasi bertingkat mulai 80% sampai dengan 100% dan dijernihkan dengan xylol (*clearing*) sebelum akhirnya ditanam dalam parafin (*embedding*). Jaringan dalam blok parafin disayat secara serial menggunakan *mikrotom rotary* dengan ketebalan 5µm dilekatkan pada gelas obyek yang telah dilapisi dengan alkohol 70%, kemudian disimpan dalam inkubator 40°C selama 24 jam. Sediaan kemudian dilapisi gelatin untuk pewarnaan secara HE dan dilapisi poly-L-lysin untuk pewarnaan dengan metode IHK (Samson and Unitily, 2014).

#### 4.6.6 Pewarnaan Preparat Histopatologi Jaringan Testis dengan Metode HE

Proses pewarnaan HE dimulai dari proses deparafinasi dengan menggunakan xylol selama 5 menit, kemudian dilanjutkan dengan proses rehidrasi menggunakan alkohol absolut 95%, 90%, 80% dan 70% secara berurutan masing-masing selama 5 menit. Jaringan kemudian dicuci dengan



aquades sekali dilanjutkan dengan PBS pH 7,4 selama 15 menit. Sediaan diwarnai dengan pewarna *Hematoxylin* selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit dan kemudian dicuci dengan akuades selama 5 menit. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan menggunakan *Eosin* selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air mengalir selama 10 menit dan akuades selama 5 menit. Setelah sediaan diwarnai, dilakukan dehidrasi dengan menggunakan alkohol bertingkat 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama beberapa detik, kemudian dilanjutkan dengan alkohol absolut I, II, dan III, masing-masing selama 2 menit. Setelah itu dilanjutkan dengan proses *clearing* dengan xylol I, II, dan III selama 3 menit. Preparat dikeringkan dan dilakukan mounting menggunakan centellan kemudian ditutup dengan *cover glass* (Sholikhatin, 2012).

#### 4.6.7 Pengamatan Preparat Jaringan Testis

Preparat jaringan testis yang telah dibuat kemudian diamati secara visual dengan menggunakan mikroskop cahaya dimulai dari perbesaran 100x, 400x dan 1000x. Pengambilan gambaran histopatologi dilakukan menggunakan kamera mikroskop. Kriteria kerusakan berupa perubahan struktur dan gambaran tubulus seminiferus testis.

#### 4.6.7 Analisis Ekspresi MDA pada Sel Spermatogenik dengan Metode IHK

Menurut Samson and Unitily (2014), pewarnaan imunohistokimia memiliki 3 tahapan yang harus dilakukan, yaitu preparasi gelas obyek yang digunakan untuk penempelan preparat atau sediaan histopatologi, pembuatan

neufren (agen penempel) untuk membantu proses *afixing* preparat ke gelas obyek dan prosedur pewarnaan imunohistokimia itu sendiri. Pewarnaan imunohistokimia meliputi beberapa tahap preparasi, antara lain preparasi gelas obyek, pelapisan (*coating*) gelas obyek dengan *neufren* (agen penempelan), penempelan preparat irisan pada gelas obyek dan prosedur pewarnaan imunohistokimia yaitu dengan memilih preparat irisan yang paling bagus, kemudian dilakukan perlakuan sesuai prosedur berikut ini :

1. Deparafinasi (xyloI III, II, I). Merupakan suatu proses menghilangkan parafin yang terdapat di dalam jaringan. Proses ini dimaksudkan untuk mempermudah proses masuknya zat warna ke dalam jaringan. Caranya adalah preparat dimasukkan ke dalam xyloI bertingkat I sampai III masing-masing selama lima menit.
2. Rehidrasi (alkohol absolut III, II, I - 95%, 90%, 85%, 80%, 70%), DW/milique (MQ) selama 10-15 menit.
3. Penghilangan peroksidase endogen (jika terlambat hasilnya positif semua) dengan menggunakan substrat metanol (dicampur sesaat sebelum gelas obyek dimasukkan) dengan cara dicelup dan dibiarkan selama 15 menit.
4. Dilakukan pencucian dengan menggunakan mikropipet: (a) DW/MQ sebanyak 100  $\mu$ L selama 5-10 menit (2x) dilanjutkan pencucian dengan menggunakan (b) PBS (*phospat buffer saline*) sebanyak 100  $\mu$ L selama 5-10 menit (2x).

5. Permukaan sediaan di sekitar jaringan dikeringkan menggunakan kertas tisu dengan tetap menjaga jaringan untuk tidak kering, kemudian dibuat lingkaran pembatas di sekitar jaringan dengan menggunakan *hydrophobic marker*. Sediaan selanjutnya disejajarkan secara mendatar dalam PBS (agar memblok antigen/Ag non spesifik dan tidak mengacaukan reaksi), kotak kemudian ditutup rapat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit.
6. Dicuci dengan PBS (100 µL) selama 5 menit (3x).
7. Diberi antibodi/Ab primer anti MDA dan diinkubasi dalam refrikator suhu 4°C selama 1 malam. Penggunaan Ab primer tersebut disesuaikan dengan senyawa atau bahan bioaktif yang akan dideteksi.
8. Dicuci lagi menggunakan PBS (100 µL) selama 10 menit (3x).
9. Diberi antibodi/Ab sekunder yaitu universal antibodi sekunder sebanyak 50-60 atau 80 µL per preparat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30-60 menit (tahap ini berlangsung dalam suasana gelap, tidak boleh ada cahaya).
10. Dicuci dengan PBS (100 µL) selama 5 menit (3x).
11. Visualisasi dilakukan dengan menggunakan: DAB (3,3-diaminobenzidine) sebanyak 10 mg dalam *tris buffer* (50 cc) yang dicampur dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 µL). Proses pencampuran ini dilakukan sesaat sebelum preparat dimasukkan dan kemudian ditutup (gelap) selama 25 menit. Bahan bioaktif yang terdeteksi akan terwarnai coklat.

12. Dicuci atau dimasukkan dalam DW/MQ (*stopping point*) selama 10-15 menit.
13. Counterstain dengan *Hematoxylin*-DW/MQ (optional).
14. Dehidrasi (70%, 80%, 85%, 90%, dan 95%) bagian bawah gelas obyek dilap tisu (untuk menghindari terjadinya pengenceran), dilanjutkan ke alkohol absolut I, II, III, bagian bawah gelas obyek dilap dengan tisu lagi, *clearing* (xylol I, II, III) dan *mounting*. Selanjutnya sediaan histopatologi siap diamati di bawah mikroskop, direkam dengan menggunakan foto digital sebanyak 10 lapang pandang menggunakan perbesaran 1000x dan dihitung manual.

#### 4.6.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini berupa data kuantitatif untuk mengetahui ekspresi MDA melalui perhitungan manual yang berwarna coklat sebagai sel yang mengekspresikan MDA. Hasil perhitungan kemudian dianalisa dengan *one way* ANOVA menggunakan Microsoft Office Excel dan SPSS untuk *Windows* dengan  $\alpha=0,05$ . Gambaran preparat jaringan testis dianalisis secara kualitatif dengan melihat adanya perubahan kerusakan sel selama proses spermatogenesis.

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

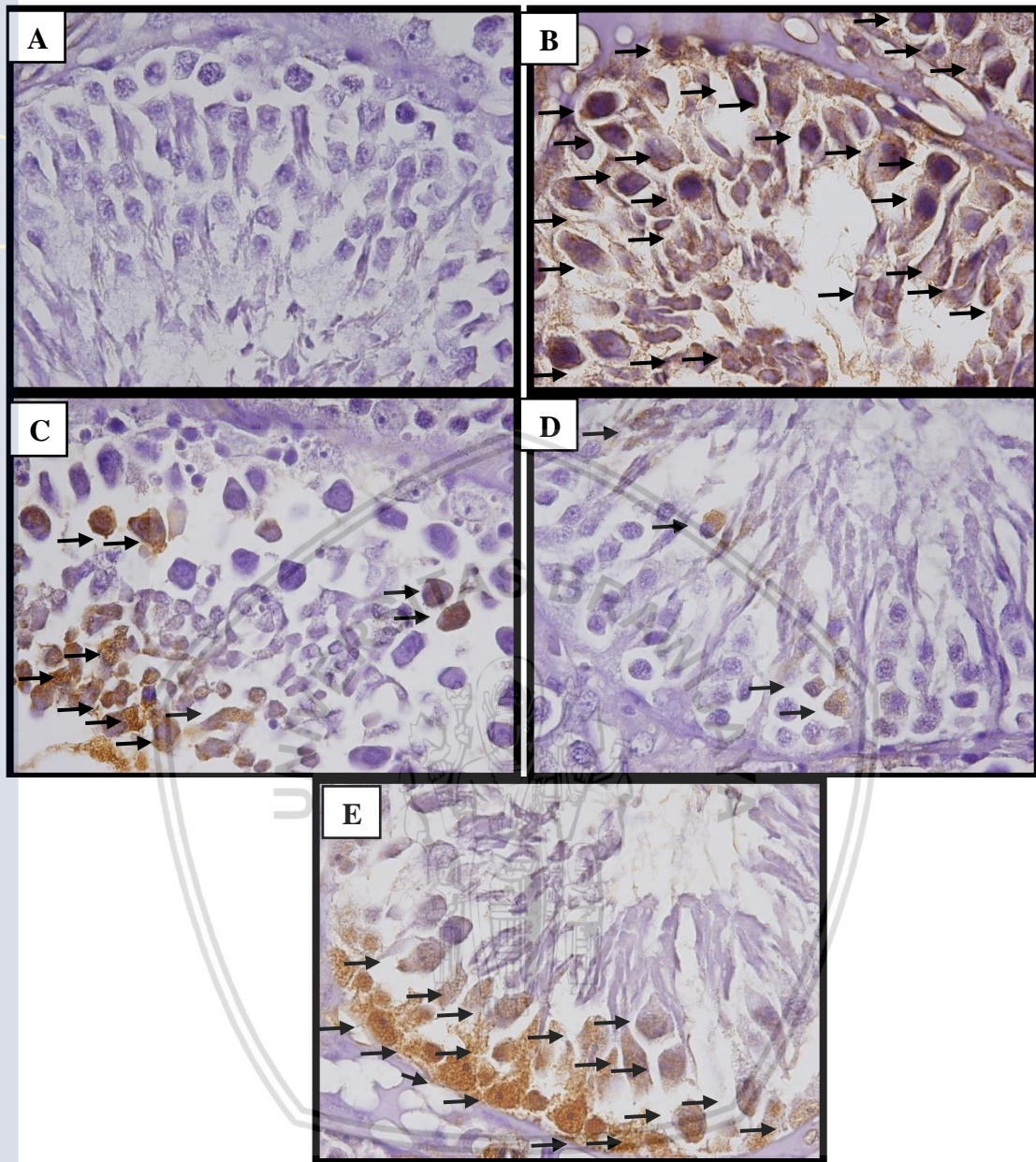
#### 5.1 Potensi Ekstrak Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Ekspresi MDA Sel Spermatogenik Jaringan Testis Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

Potensi ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) terhadap ekspresi MDA (Malondialdehida) pada jaringan testis tikus putih (*Rattus novergicus*) diamati dengan menggunakan metode immunohistokimia (IHK). Hasil gambaran IHK testis ditandai dengan adanya ekspresi MDA pada tikus putih usia tua yang memiliki banyak radikal bebas di dalam tubuhnya. Pengamatan dilakukan dengan 10 kali lapang pandang menggunakan perbesaran 1000x. Ekspresi MDA ditandai dengan adanya warna coklat pada jaringan akibat adanya ikatan antigen dan antibodi pada jaringan yaitu antibodi primer dan antibodi sekunder sehingga dengan penambahan substrat kromagen akan menimbulkan warna kecoklatan.

MDA (*Malondialdehyde*) merupakan produk akhir peroksidasi lemak tak jenuh dalam tubuh oleh radikal bebas. Penuaan atau *aging* memicu peningkatan stress oksidatif dan merangsang pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dalam jumlah tinggi. Tingginya kadar ROS memicu terjadinya peroksidasi lipid sehingga menghasilkan senyawa MDA (Wardani, 2010). Diharapkan dengan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan dapat menurunkan ekspresi MDA pada jaringan testis tikus usia tua.

Ekspresi MDA pada jaringan testis hewan coba kontrol negatif dalam kadar yang rendah pada keadaan normal, ditandai dengan sedikitnya bahkan hampir tidak ada area berwarna coklat pada jaringan **Gambar 5.1.A**. MDA (*Malondialdehida*) tetap ditemukan dalam kondisi normal karena tubuh tetap menghasilkan ROS (*Reactive Oxidative Stress*) dalam kadar rendah sehingga pembentukan MDA juga rendah pada jaringan testis. MDA pada kontrol positif **Gambar 5.1.B** terekspresi pada sitoplasma sel spermatogenik, ditandai dengan banyaknya area berwarna coklat pada jaringan dan tampak hampir seluruh area terwarnai coklat jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Sedangkan pada **Gambar 5.1.C** ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dengan dosis 100 mg/kg BB, **Gambar 5.1.D** ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dengan dosis 200 mg/kg BB, **Gambar 5.1.E** ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dengan dosis 300 mg/kg BB intensitas penyebaran warna coklat pada tubulus seminiferus tampak lebih sedikit terekspresi dibandingkan dengan **Gambar 5.2.B** kontrol positif. Hal tersebut dikarenakan terjadi penghambatan pembentukan MDA pada jaringan testis yang sebelumnya telah diberi ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*).





**Gambar 5.1.** Hasil Imunohistokimia Jaringan Testis

A = Kontrol negatif (tikus muda), B = Kontrol positif (tikus tua),  
 C= Perlakuan 1 (pemberian ekstrak etanol pegagan 100mg/kgBB),  
 D = Perlakuan 2 (pemberian ekstrak etanol pegagan 200mg/kgBB),  
 E = Perlakuan 3 (pemberian ekstrak etanol pegagan 300mg/kgBB).

**Keterangan :**      → = Ekspresi MDA



Hasil akumulasi ekspresi MDA dianalisis secara statistika dengan ANOVA dan menunjukkan adanya perbedaan secara signifikan ( $p < 0,05$ ) antar perlakuan. Kelompok kontrol positif memiliki rata-rata ekspresi MDA lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif, kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, dan kelompok perlakuan 3. Ekstrak etanol tanaman pegagan dapat menurunkan ekspresi MDA pada tikus usia tua (**Tabel 5.1**).

**Tabel 5.1.** Ekspresi MDA pada Jaringan Testis Tikus Tua Pasca Terapi dengan Ekstrak Etanol Tanaman Pegagan

Kelompok	Rata-rata Ekspresi MDA $\pm$ SD (sel yang teramati)	Penurunan terhadap Kontrol Positif (%)
Kontrol Negatif	$1,20 \pm 1,04^a$	
Kontrol Positif	$39,00 \pm 4,97^c$	
Dosis 1 (100 mg/kg BB)	$14,00 \pm 2,32^b$	64,1
Dosis 2 (200 mg/kg BB)	$5,20 \pm 2,39^a$	86,7
Dosis 3 (300 mg/kg BB)	$18,40 \pm 2,72^b$	52,8

Keterangan: Notasi a, b, dan c menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ) antar perlakuan.

Hasil uji normalitas dan uji homogenitas varian menunjukkan nilai signifikansi ( $p > 0,05$ ), dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi dan homogenitas yang normal, sehingga dilanjutkan dengan uji *one way* ANOVA. Uji *one way* ANOVA pada **Tabel 5.1** menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ) antar perlakuan dan ekstrak pegagan dapat menghambat produksi MDA (lampiran 6). Hasil uji *pos hoc tukey* menunjukkan kelompok perlakuan ekstrak etanol tanaman pegagan memiliki perbedaan yang nyata dengan kontrol positif yang

ditandai perbedaan notasi (**Tabel 5.1**). Terlihat pada tabel bahwa ekspresi MDA pada KP (kelompok positif) berbeda signifikan jika dibandingkan dengan kelompok KN (kontrol negatif) yang ditunjukkan dengan terjadinya peningkatan ekspresi MDA pada KP (kelompok positif). Pada kelompok perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3 dapat dilihat pada **Tabel 5.1** bahwa terjadi perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) jika dibandingkan dengan KP (kelompok positif), hal ini berarti dengan pemberian ekstrak etanol pegagan mampu menurunkan ekspresi MDA dibandingkan dengan KP (kelompok positif). Namun pada kelompok perlakuan 2 memiliki notasi yang tidak berbeda signifikan ( $p > 0,05$ ) dibanding KN (kelompok negatif), hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol pegagan dosis 200 mg/kg BB mampu mengembalikan ekspresi MDA seperti keadaan normal, sehingga kelompok perlakuan 2 merupakan dosis optimum untuk dosis terapi.

Nilai rata-rata pada kelompok kontrol negatif digunakan sebagai standart untuk mengetahui adanya peningkatan ekspresi MDA, sedangkan rata-rata kelompok kontrol positif digunakan sebagai standart untuk mengetahui adanya penurunan ekspresi MDA. Kelompok tikus KN (kelompok negatif) pada **Tabel 5.1** menunjukkan ekspresi MDA yang paling rendah jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain yaitu sebesar  $(1,20 \pm 1,04 \text{ sel})$ . Hal ini dikarenakan tikus KN merupakan tikus usia muda, dimana kadar radikal bebas dalam tubuh masih dalam batas ambang normal. MDA (*Malondialdehida*) tetap ditemukan dalam kondisi normal karena tubuh tetap

menghasilkan ROS (*Reactive Oxidative Stress*) dalam kadar rendah sehingga pembentukan MDA juga rendah pada jaringan testis (Baratawidjaja, 2009).

Kelompok tikus KP (kontrol positif) menunjukkan rata-rata paling tinggi dibanding kelompok perlakuan lain yaitu sebesar  $(39,00 \pm 4,97 \text{ sel})$ . Peningkatan yang signifikan ini karena tikus usia tua, sehingga mengalami peningkatan produksi MDA yang signifikan. Peroksidasi lipid dapat terjadi karena adanya aktivitas ROS (*Reactive Oxidative Stress*) yang berikatan dengan PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acids*) pada membran sel yang menunjukkan adanya kerusakan sel. Tingginya kadar ROS di dalam tubuh akan menyebabkan tingginya kadar MDA karena terjadi peningkatan peroksidasi lipid. Menurut Yones (2006), radikal peroksil dapat menyerang seluruh molekul hayati khususnya molekul asam lemak. Peroksidasi molekul asam lemak dapat dihentikan dengan membentuk senyawa yang stabil yakni MDA (Malondialdehida). Senyawa MDA ini dapat membentuk ikatan silang dengan berbagai molekul dan merupakan penanda toksisitas sel, mutagenesis, dan penguraian lipid pada membran sel (Fatriyawan dkk., 2013).

Penelitian menunjukkan hasil bahwa pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan dapat menurunkan proses lipid peroksidasi dalam tubuh yang berhubungan dengan penurunan ekspresi MDA. Hal ini sesuai dengan penelitian Anita (2015) perlakuan latihan fisik (*treadmill*) yang dilakukan secara teratur dapat meningkatkan pertahanan antioksidan endogen yang menyebabkan penurunan ROS (*Reactive Oxydative Stress*) yang disertai

dengan penurunan peroksidasi lipid, sehingga terjadi penurunan kadar MDA dan merupakan salah satu tanda perbaikan sel pada jaringan.

Setelah pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) dalam tiga dosis yang berbeda menunjukkan penurunan ekspresi MDA dibandingkan tikus putih usia tua tanpa perlakuan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*). Perbandingan antara ekspresi MDA sel spermatogenik testis usia tua setelah diberi perlakuan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (**Tabel 5.1**). Kelompok perlakuan 1 dengan dosis ekstrak etanol tanaman pegagan sebesar 100 mg/kg BB mengalami penurunan ekspresi MDA sebesar 64,1% menjadi ( $14,00 \pm 2,32$  sel). Perbedaan dosis ekstrak etanol tanaman pegagan yang diberikan berpengaruh dalam menurunkan ekspresi MDA sel spermatogenik testis karena ekstrak etanol tanaman pegagan mengandung zat-zat yang berfungsi sebagai antioksidan. Hal ini sesuai dengan penjelasan Kormin (2005), tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mengandung berbagai macam senyawa kimia seperti triterpenoid, minyak esensial, flavonoid, dan komponen lain seperti polisakarida, polyne-alkaline, sterol, tannin, dll. Selain itu tanaman pegagan (*Centella asiatica*) juga memiliki kemampuan sebagai antioksidan yaitu senyawa flavonoid.

Sedangkan pada kelompok perlakuan 2 dengan pemberian dosis 200 mg/kg BB ekspresi MDA mengalami penurunan sebesar 86,7% menjadi ( $5,20 \pm 2,39$  sel). Penurunan ekspresi MDA diduga terjadi karena senyawa isoflavon ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) mampu

mencegah terjadinya peroksidasi lipid. Hal ini sesuai dengan penelitian Chori (2013) bahwa senyawa isoflavon ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) bekerja secara sinergis dengan enzim antioksidan intrasel sehingga aktivitas enzim antioksidan yang terdapat pada hepar dapat dipertahankan untuk tidak turun secara drastis. Fungsi flavonoid secara umum dalam menetralkan radikal bebas yang terbentuk di dalam tubuh diduga melalui mekanisme kapasitas antioksidan dan stimulasi gen bertanggung jawab terhadap sintesis enzim antioksidan (Fatriyawan dkk., 2016).

Yones (2006) menyatakan bahwa flavonoid merupakan hasil metabolisme sekunder polifenol. Flavonoid dapat menghambat aktivitas biologi diantaranya anti alergi, anti virus dan peradangan. Sedangkan efek farmakologi, telah dihubungkan dengan sifat antioksidan molekul ini, yaitu dapat menekan bentuk ROS (*Reactive Oxygen Species*) dengan menghambat enzim, mencegah spesies radikal khususnya spesies oksigen reaktif dan melindungi sel dari antioksidan yang bersifat radikal. Antioksidan flavonoid berfungsi sebagai pencegahan radikal bebas dengan mendonorkan atom hidrogen 3",4"-dihidroksi pada cincin B merupakan target radikal bebas yang bermanfaat sebagai antioksidan. Ikatan ganda karbo C-2 dan C-3 berkonjugasi dengan gugus 4-keto yang responsible untuk perpindahan elektron pada cincin B dan meningkatkan kapasitas pencegahan radikal. Sedangkan 7,8-dihidroksi pada cincin A akan menurunkan aktivitas radikal bebas. Setelah diketahui flavonoid dari tanaman pegagan yang berfungsi sebagai antioksidan di atas, pada penelitian ini diharapkan tanaman pegagan

dapat menurunkan ekspresi MDA sel spermatogenik pada testis tikus putih usia tua.

Kemudian pada kelompok perlakuan 3 dengan pemberian dosis 300 mg/kg BB mengalami penurunan sebesar 52,8% menjadi ( $18,4 \pm 2,72$  sel). Pada kelompok perlakuan 3 ini mengalami penurunan ekspresi MDA dibandingkan dengan kelompok KP (kontrol positif) dan mengalami kenaikan dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2 dosis 200 mg/kg BB. Hal ini menyebabkan dosis 300 mg/kg BB menghasilkan produk senyawa toksik yang mampu membentuk senyawa radikal bebas baru sehingga mekanisme kerja dari antioksidan ekstrak tanaman pegagan tidak optimal dan bersifat toksik. Adapun senyawa toksik yang diproduksi akibat dari jumlah dosis berlebihan. Toksisitas adalah tingkat merusakannya suatu zat jika dipaparkan terhadap mikroorganisme dan efek terhadap struktur organisme (Alaiya dkk., 2015).

Dari hasil penelitian, dapat diketahui rata-rata ekspresi MDA terendah pada perlakuan pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan dengan perlakuan 2 dosis 200 mg/kg BB yakni sebesar ( $5,20 \pm 2,39$  sel). Dosis pada perlakuan 2 tersebut merupakan dosis optimum untuk terapi ekstrak etanol tanaman pegagan. Pada perlakuan 1 dosis 100 mg/kg BB kurang optimum karena ekspresi MDA belum mendekati keadaan normal yaitu tikus usia muda. Sedangkan pada perlakuan 3 dosis 300 mg/kg BB terjadi peningkatan ekspresi MDA yang dikarenakan adanya toksisitas yang ditimbulkan oleh ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*).

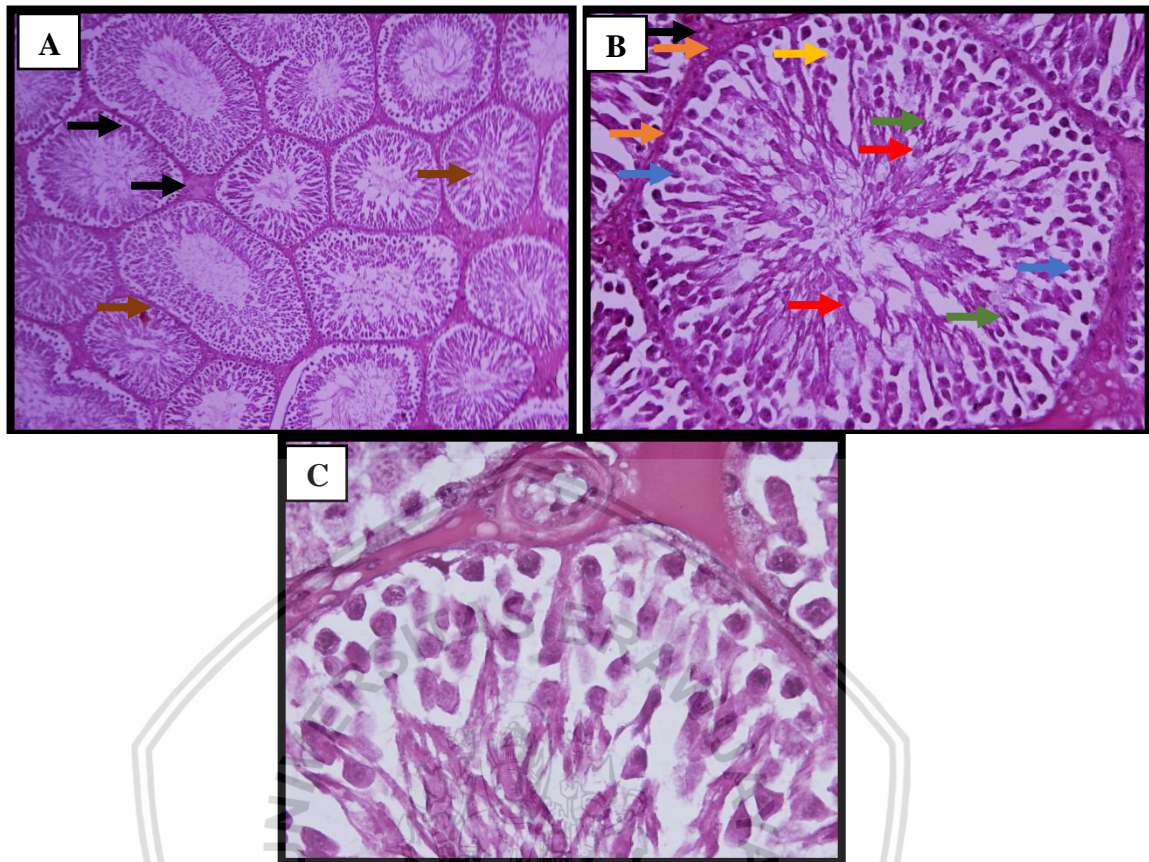


## 5.2 Potensi Ekstrak Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Spermatogenesis Jaringan Testis Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

Hasil penelitian potensi ekstrak etanol tanaman pegagan terhadap spermatogenesis jaringan testis dengan pewarnaan HE (*hematoxyline-eosin*) dianalisa secara deskriptif menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x, 400x dan 1000x. Pewarnaan HE dapat digunakan dalam mengamati struktur histopatologi testis dan berguna dalam mengenali adanya perubahan morfologi dan struktur dasar sel atau jaringan. Pada gambaran histopatologi jaringan testis dibawah ini menunjukkan adanya perubahan histopatologi testis masing-masing perlakuan.

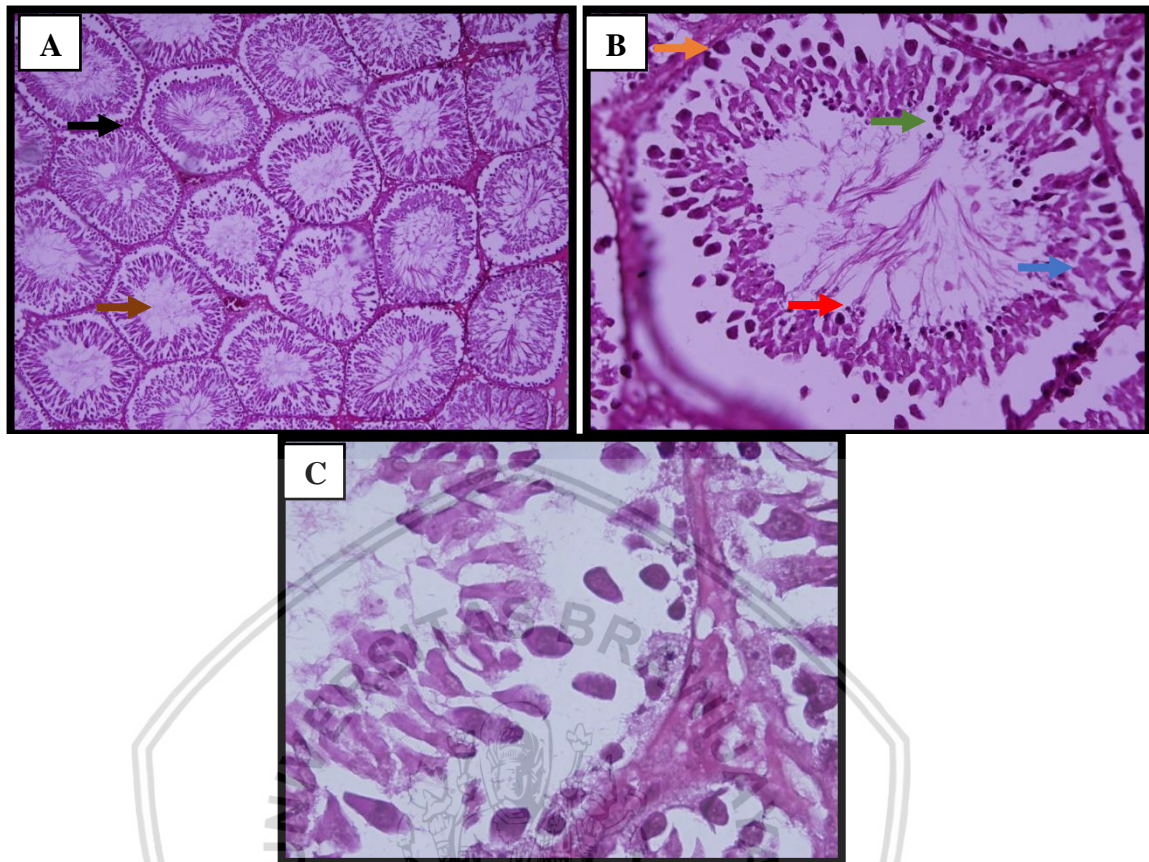
Jaringan testis normal pada **Gambar 5.2** terdapat sel-sel spermatogonium yang masih menempel pada membran basalis tubulus seminiferus, serta lumen tubulus yang penuh dengan spermatozoa. Keadaan tikus usia tua pada **Gambar 5.3** terlihat bahwa sel-sel spermatogonium terlepas dari membran basalis, serta lumen tubulus seminiferus lebih lebar atau tidak berisi spermatozoa. Kelompok perlakuan 1 pada **Gambar 5.4** mulai menunjukkan adanya perbaikan pada tubulus seminiferus. Kelompok perlakuan 2 pada **Gambar 5.5** terlihat hampir mendekati keadaan normal yaitu tikus muda kelompok negatif (KN). Namun kelompok perlakuan 3 pada **Gambar 5.6** mulai mengalami kerusakan sel yang ditandai dengan sebagian sel spermatogonium terlepas dari membran sel dan pada lumen tubulus seminiferus terdapat sedikit spermatozoa.





**Gambar 5.2.** Gambaran histopatologi penampang melintang testis  
(Kontrol Negatif)

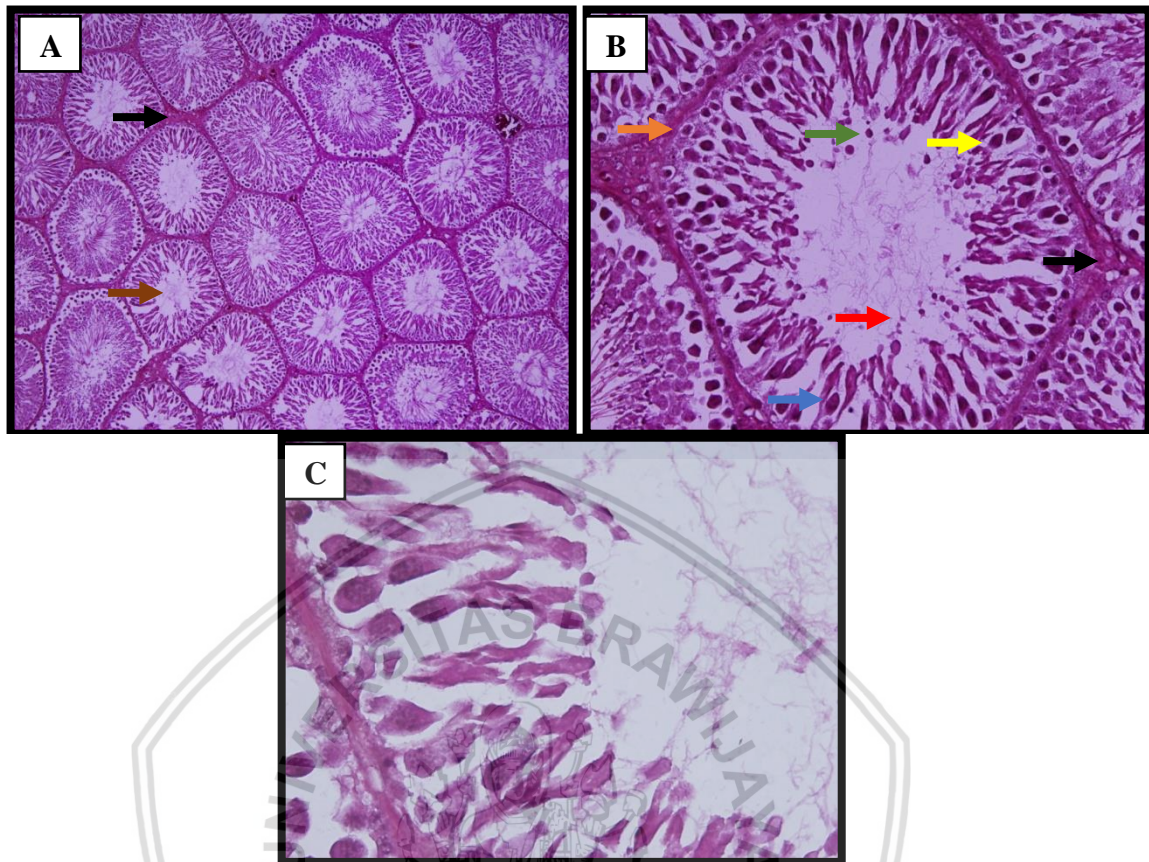
**Keterangan :** A = Penampang melintang testis perbesaran 100x  
 B = Penampang melintang testis perbesaran 400x  
 C = Penampang melintang testis perbesaran 1000x  
 → = Sel Leydig,      → = Sel Sertoli,      → = Spermatogonium,  
 → = Spermatosit primer,      → = Spermatid,      → = Spermatozoa,  
 → = perubahan lumen tubulus seminiferus.



**Gambar 5.3.** Gambaran histopatologi penampang melintang testis  
(Kontrol Positif)

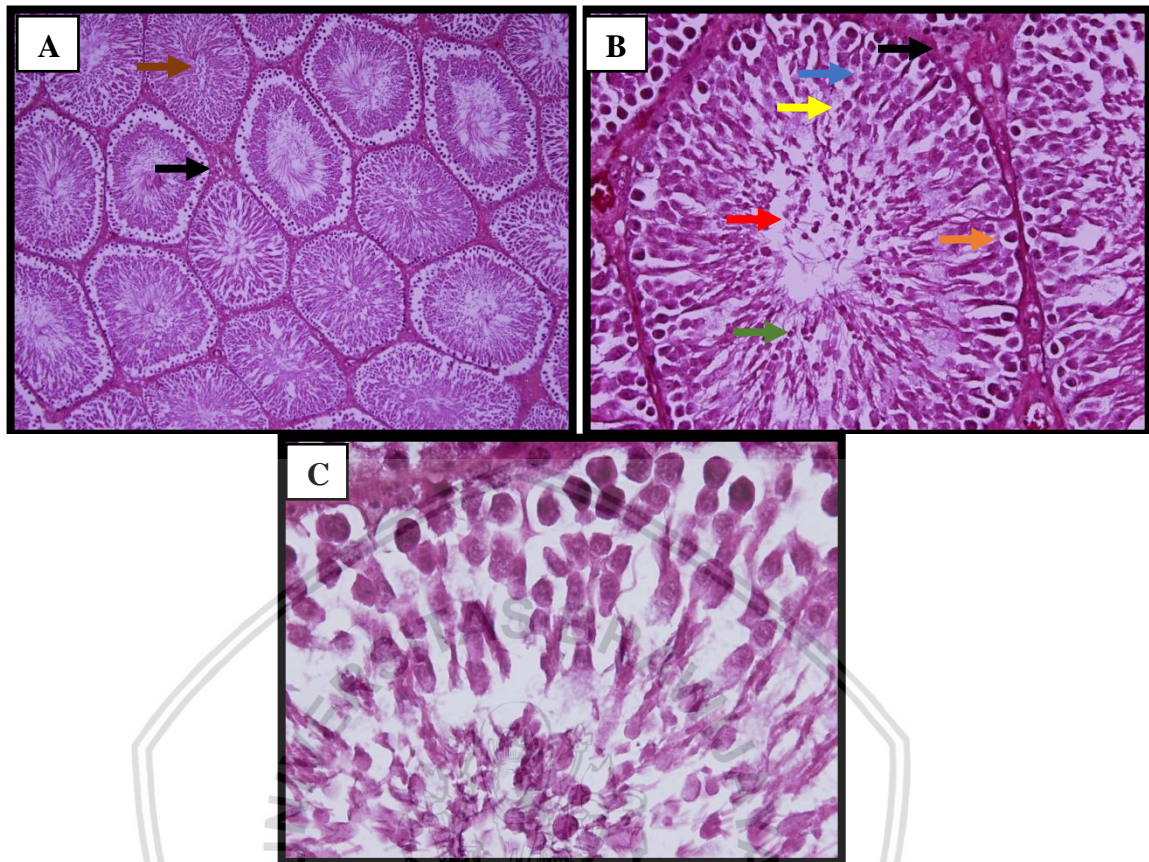
**Keterangan :** A = Penampang melintang testis perbesaran 100x  
 B = Penampang melintang testis perbesaran 400x  
 C = Penampang melintang testis perbesaran 1000x  
 → = Sel Leydig, → = Sel Sertoli, → = Spermatogonium,  
 → = Spermatosit primer, → = Spermatid, → = Spermatozoa,  
 → = perubahan lumen tubulus seminiferus.





**Gambar 5.4.** Gambaran histopatologi penampang melintang testis  
(Perlakuan Dosis 100 mg/kg BB)

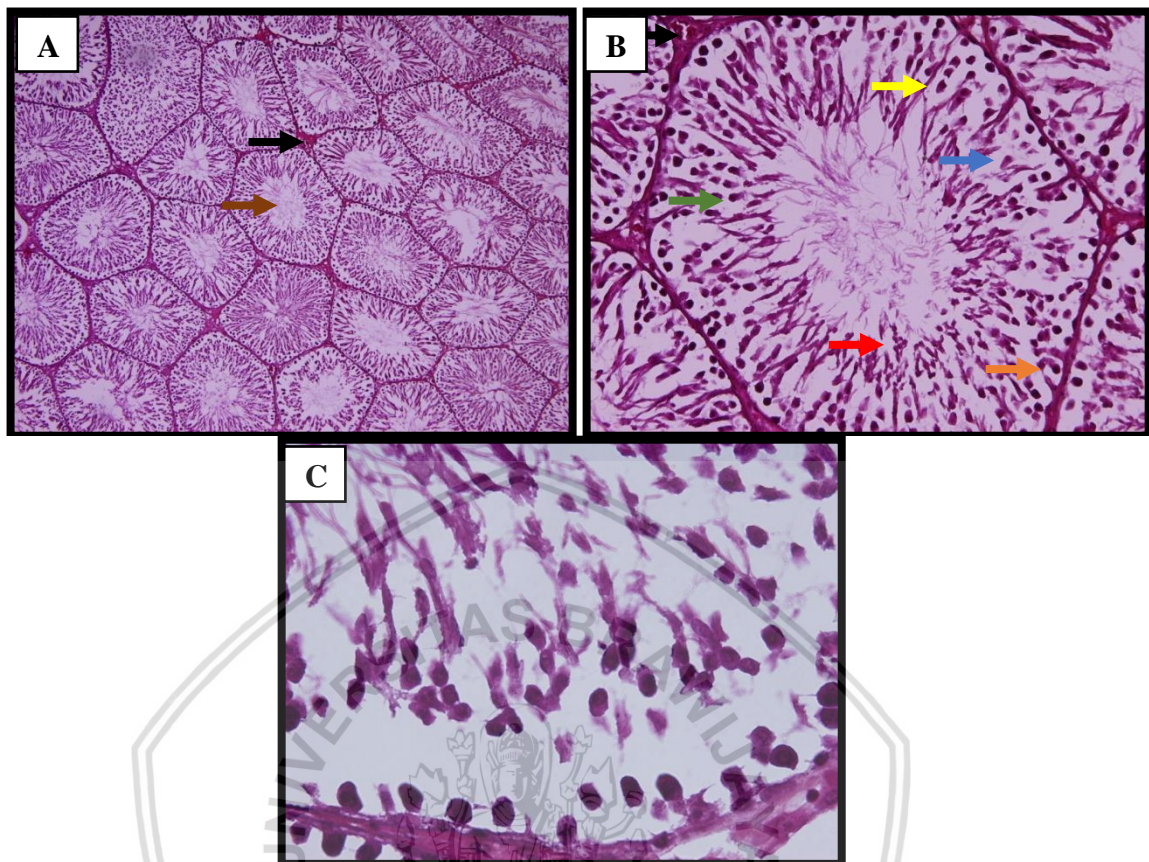
**Keterangan :** A = Penampang melintang testis perbesaran 100x  
 B = Penampang melintang testis perbesaran 400x  
 C = Penampang melintang testis perbesaran 1000x  
 → = Sel Leydig, → = Sel Sertoli, → = Spermatogonium,  
 → = Spermatosit primer, → = Spermatid, → = Spermatozoa,  
 → = perubahan lumen tubulus seminiferus.



**Gambar 5.5.** Gambaran histopatologi penampang melintang testis  
(Perlakuan Dosis 200 mg/kg BB)

**Keterangan :** A = Penampang melintang testis perbesaran 100x  
 B = Penampang melintang testis perbesaran 400x  
 C = Penampang melintang testis perbesaran 1000x  
 → = Sel Leydig, → = Sel Sertoli, → = Spermatogonium,  
 → = Spermatosit primer, → = Spermatid, → = Spermatozoa,  
 → = perubahan lumen tubulus seminiferus.





**Gambar 5.6.** Gambaran histopatologi penampang melintang testis  
(Perlakuan Dosis 300 mg/kg BB)

**Keterangan :** A = Penampang melintang testis perbesaran 100x  
 B = Penampang melintang testis perbesaran 400x  
 C = Penampang melintang testis perbesaran 1000x  
 → = Sel Leydig,      → = Sel Sertoli,      → = Spermatogonium,  
 → = Spermatosit primer,      → = Spermatid,      → = Spermatozoa,  
 → = perubahan lumen tubulus seminiferus.

Gambaran histopatologi pada hasil pengamatan tubulus seminiferus testis tikus muda kelompok KN (kontrol negatif) (**Gambar 5.2**) memperlihatkan struktur sel sertoli, tubulus seminiferus tampak normal dengan warna nukleus yang lebih pucat dan bentuk selnya memanjang yang tipis pada membrane basalis. Pada struktur histopatologi normal sel leydig memiliki inti yang bulat dan sitoplasma granular pada pewarnaan HE.

Gambaran mikroanatomi tubulus seminiferus testis yang normal akan menunjukkan asosiasi sel spermatogenik tersusun berlapis sesuai dengan tingkat perkembangannya dari membran basalis menuju ke arah lumen tubulus yakni spermatogonia, spermatosit, dan spermatid. Diantara tubulus seminiferus terdapat sel interstisial salah satunya yaitu sel leydig dengan susunan sel yang rapat dan kompak. Pada lumen tubulus seminiferus tampak terisi penuh oleh spermatozoa (Junquiera, 2007).

Pada kelompok KP (kontrol positif) tikus usia tua tampak sel spermatogonium rusak dan hilang, jarak antar spermatogonium lebih jauh dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Kepadatan terlihat lebih sedikit di lumen tubulus, terlihat pada (**Gambar 5.3**) lumen tubulus seminiferus mengandung spermatosit dan spermatid yang lebih sedikit sehingga lumen terlihat lebih besar dan tidak terisi penuh dengan spermatozoa. Kemudian pada membran basalis tubulus seminiferus juga tampak lepasnya sel spermatogonium, sehingga bagian membrana basalis terlihat kosong.

Testis sebagai tempat berlangsungnya spermatogenesis bersifat sangat rentan terhadap proses oksidasi oleh radikal bebas. Radikal bebas ini akan menimbulkan gangguan pada spermatogenesis dan membran spermatozoa. Membran sel spermatogenik mengandung sejumlah besar asam lemak tak jenuh rantai ganda. Bila radikal bebas yang terbentuk bertemu dengan asam lemak tak jenuh ganda dengan membran sel, akan terjadi reaksi peroksidasi lipid dari membran sel tersebut yang mengakibatkan peningkatan fluiditas

membran dan inaktifasi ikatan membran dengan enzim dan reseptor. Hal ini akan menyebabkan peningkatan kerusakan sel termasuk sel spermatozoa (Sikka, 1996).

Pada percobaan kelompok 1, setelah pemberian dosis sebesar 100 mg/kg BB tampak lumen tubulus seminiferus hampir penuh jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Lumen tubulus seminiferus pada **Gambar 5.4** lebih kecil dibanding dengan lumen tubulus kelompok kontrol positif. Sedangkan pada kelompok 3 dengan pemberian dosis sebesar 300mg/kg BB terlihat pada **Gambar 5.6**, lumen tubulus seminiferus lebih kecil jika dibandingkan dengan KP (kelompok positif), tetapi tidak lebih besar jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan 2.

Pada kelompok perlakuan 1 dosis 100 mg/kg BB telah menampakkan adanya efek dari terapi pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan, yang ditandai dengan adanya perbaikan pada tubulus seminiferus. Sedangkan pada kelompok perlakuan 3 dosis 300 mg/kg BB ini mengalami perbaikan pada tubulus seminiferus jika dibandingkan dengan kelompok KP (kontrol positif). Namun, dosis 300 mg/kg BB tidak menunjukkan dosis yang optimum, dikarenakan pemberian dosis yang berlebih akan mengakibatkan adanya senyawa toksik yang mampu membentuk senyawa radikal bebas baru sehingga dapat merusak jaringan testis pada tubulus seminiferus.

Kelompok perlakuan 2 yaitu pemberian dosis sebesar 200 mg/kg BB pada **Gambar 5.4** menunjukkan perubahan gambaran histopatologi tubulus seminiferus yang ditandai dengan terlihatnya sel sertoli, sel spermatogonium



dan spermatozoa mengisi bagian lumen tubulus seminiferus hingga mendekati keadaan KN (kontrol negatif). Kemudian tidak adanya kerusakan sel sertoli dan sel leydig yang menandakan spermatogenesis berjalan normal (Junquiera, 2007). Selain senyawa flavonoid, tanaman pegagan (*Centella asiatica*) juga mengandung fitosterol yang merupakan turunan senyawa sterol yang dahulu hanya ditemukan pada hewan dalam bentuk kolesterol sebagai bahan baku pembentuk hormon seksual.

Menurut penelitian Hutasuhut (2014) ekstrak etanol herba kemangi (*Ocimum americanum* L.) memiliki kandungan fenol dan fitosterol yang dapat meningkatkan kualitas sperma dan konsentrasi sperma. Fitosterol yang terkandung juga dapat bertindak sebagai prekursor steroid untuk mempengaruhi sel leydig memproduksi hormon testosteron, sehingga terjadi peningkatan hormon testosteron. Hormon ini berperan penting dalam proses pembentukan spermatozoa melalui spermatogenesis di dalam testis serta pematangan sperma dalam epididimis. Senyawa-senyawa fitosterol yang terdapat pada tumbuhan antara lain sitosterol, stigmasterol dan kampesterol (Ramadhan, 2008).

Elyal (2002) menjelaskan, bahwa fitosterol merupakan triterpena yang kerangka dasarnya sistem cincin *siklopentana perhidrofenantrena*, kerangka dasar tersebut menyerupai kerangka steroid yaitu kolesterol. Senyawa triterpenoid dapat meningkatkan senyawa steroid dalam darah. Peningkatan kadar steroid dalam darah disebabkan oleh senyawa triterpenoid yang memiliki keserupaan dan kemungkinan adanya kaitan biogenesis dengan

steroid dan steroid merupakan bahan baku untuk mensintesis hormon testosteron. Kolesterol dipakai untuk biosintesis hormon steroid yang mencakup hormon seks, diantaranya androgen (testosteron).

Meningkatnya kadar steroid akan diikuti pula dengan meningkatnya hormon testosteron. Dari hasil penelitian, dapat diketahui sel spermatogenik dan keadaan tubulus seminiferus testis pada perlakuan 2 yaitu pemberian ekstrak etanol pegagan dengan dosis 200 mg/kg BB mendekati dengan keadaan normal. Dosis 200 mg/kg BB merupakan dosis optimum untuk terapi ekstrak etanol pegagan. Pada perlakuan 1 dosis 100 mg/kg BB kurang optimum karena keadaan lumen tubulus seminiferus belum mendekati keadaan normal. Sedangkan pada perlakuan 3 dosis 300 mg/kg BB keadaan lumen tubulus seminiferus mendekati keadaan KP (kontrol positif) yang dikarenakan adanya toksisitas yang ditimbulkan oleh ekstrak etanol pegagan.

## BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) menurunkan ekspresi MDA sel spermatogenik pada jaringan testis tikus putih (*Rattus novergicus*) usia tua dengan dosis pemberian paling efektif yaitu 200 mg/kg BB.
2. Pemberian ekstrak etanol tanaman pegagan (*Centella asiatica*) meningkatkan jumlah sel spermatogenik selama proses spermatogenesis jaringan testis pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) usia tua dengan dosis pemberian paling efektif yaitu 200 mg/kg BB.

### 6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka saran yang dapat diberikan yaitu :

1. Perlu dilakukan penelitian lanjut mengenai penggunaan hewan coba yang sering digunakan untuk breeder seperti kucing, kambing, dan sapi.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai hubungan peningkatan sperma dan perbaikan sistem reproduksi fisiologis pada hewan usia tua.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afifatunnisa, Soeharto, Gatot, dan Hadi. 2013. Pengaruh Lama Waktu Kematian Terhadap Kemampuan Motilitas Spermatozoa Testis Hewan Coa Post Mortem yang Diperiksa pada Suhu Kamar [Skripsi]. Semarang : Universitas Dipenogoro.
- Aitken, R. J. dan S. D Roman. 2008. Antioxidant System and Oxidative Stress in The Testes. *Journal Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1(1): 15-24.
- Akbar, B. 2010. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Anti Fertilitas*. Jakarta : Adabia Press. 4-5
- Akmal, M., Aulanni'am, M. Widodo, B. Sumitro, and B. Purnomo. The Impiortant Role of Protamine in Spermatogenesis and Quality of Sperm : A Mini Review. *Asian Pasific Journal of Reproduction*, 5(5) : 357-360.
- Alaiya, S. A. Nour, dan S. Hari. 2015. Peran Air Perasan Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap *Superoxide Dismutase* (SOD) pada Tikus. *Jurnal Ilmiah Biosaintropis (Bioscience-Tropic)*. 1(1) : 35-45
- Alvionita, D. R. Siti, dan S. Nurcholidah. 2015. Kualitas Semen Domba Lokal pada Berbagai Kelompok Umur. *Jurnal Ilmiah Fakultas Peternakan Universitas Padjajaran*.
- Anita, D. C. 2015. Kadar Glukosa dan Malondialdehid Ginjal Tikus Diabetes yang Diberi Latihan Fisik. *Muhammadiyah Journal of Nursing*. 1(2) : 109-116.
- Ayala, A., M. F. Munoz, and S. Arguelles. 2014. *Lipid Peroxidation : Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-hydroxy-2-noneal*. Ox Med Cel Long.
- Baratawidjaja, K. G. 2009. *Imunologi Dasar Edisi ke-8*. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 477-513.
- Baskoro, A. dan P. G. Konthen. 2008. Basic Immunology of Aging Process. Naskah lengkap pada 5<sup>th</sup> Bali Endocrine Update 2<sup>nd</sup> Bali Aging and Geriatric Update Symposium. Bali 11-13 April, 2008.
- Bayyinatul, M. 2011. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (centella asiatica) terhadap Jumlah Corpus Luteum dan Kebuntingan Mencit (Mus musculus) Betina*. <http://www.berkalahayati.org/index.php/bph/article.download/234/170>. [Diakses tanggal 19 Agustus 2017].

- Brinkhaus, B., M. Lindner., D. Schuppan, and E. G. Hahn. 2000. Chemical, Pharmacological and Clinical Profile of The East Asian Medical Plant *Centella asiatica*. *Review article Phytomedicine*, 7(5) : 427-448.
- Chori, Finka. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L) terhadap Kadar Superoksida Dismutase (SOD) dan Malondialdehida (MDA) Hepar Mencit Betina (*Mus musculus*) yang diinduksi 7,12-dimetilbenz ( $\alpha$ ) Antrasen Secara In Vivo [Skripsi]. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Malang.
- Constantinescu, G. M. 2007. Anatomy of Reproductive Organs. Didalam: Schatten, H. Constatinencu, G. M., editor. *Comparative Reproductive Biology*. Iowa: Blackwell Publishing, page : 5-23.
- Dairani, E. 2006. Efek Jangka Pendek Pemaparan 2-Methoxyethanol terhadap Kadar Malondialdehyde dan jumlah Spermatozoa Tikus Putih (*rattus novergicus*) [Skripsi]. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Univeritas Airlangga, Surabaya.
- Dolores, D. M. and C. Y. Cheng. 2004. *Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in The Seminiferous Epithelium During Spermatogenesis*. *Endocrine Rev.* 25:747-806.
- Elyall, B. 2002. Pengaruh Infus Daun Puding (*Polyscias guifolei* L. H. Bayle) terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Jantan (*Rattus novergicus*) Galur DDY. *Jurnal Makara, Sains*. 6 (2): 99-104.
- Faranita, O. V. 2009. Kualitas Spermatozoa pada Tikus Wistar Jantan Diabetes Melitus [Skripsi]. Semarang : Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Fatimah, N. Ammalia, Innawati, Setiawati dan Jusuf. 2014. Gambaran Kadar Malondialdehida (MDA) Serum pada Lansia. *Artikel Studi Kasus*. Unit Rehabilitasi Sosial Pucang Gading Semarang, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Fatriyawan, A. A., C. Mahdi., Aulanni'am, and D. K. Wuragil. 2016. The Ethanolic Therapy of Ceremai Leaves (*Phyllanthus acidus* (L.) Skeels) on Malondialdehyde (MDA) Levels and Histopatology of Hepar of Hypercholesterolemic Rats. *Interantional Journal of ChemTech Research*. Vol 9, No 04 pp 509-512

- Fitriyah. 2009. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegegan (*Centella asiatica*) terhadap Perkembangan Folikel Ovarium Mencit (*Mus musculus*) [Skripsi]. Malang : Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Gohil, K. J., A. P. Jagruti, and K. Gajjar. 2010. Pharmacological Review on *Centella asiatica* : A Potential Herbal Cure-all. *Review Article* p546-556.
- Goldman, R. dan R. Klatz. 2007. *The New Anti Aging Revolution*. Malaysia : Printmate Sdn. Bhd. p. 19-25.
- Halliwel, B. and J. M. C. Gutteridge. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York : Oxford University Press.p.19-63.
- Hutasuhut, Riamayanti. 2014. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 70% Herba Kemangi (*Ocimum americanum* L.) terhadap Kualitas Sperma dan Densitas Sel Spermatogenik Tikus Sparague-Dawley Jantan Secara In Vivo [Skripsi]. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas UIN Syarif Hidayatullah.
- Hayati, A., S. Mangkoewidjojo., A. Hinting., and S. Moeljopawiro. 2006. Hubungan Kadar MDA Sperma dengan Integritas Membran Spermatozoa Tikus (*Rattus novergicus*) Setelah Pemaparan 2-Methoxyethanol. *Bek. Penel. Hayati*, 11, 151-154.
- Hayati, A. 2010. *Spermatologi*. Surabaya : Airlangga University Press.
- Irawan, R. H. W. 2012. Pengaruh Pemberian Yogurt Susu Kambing Sebagai Pencegahan untuk Hiperkolesteroleia melalui Pengamatan Malondialdedida (MDA) dan TNF- $\alpha$  pada Jantung Hewan Model Tikus (*Rattus novergicus*). *Journal of Universitas Brawijaya Malang*. 1-8
- Junquiera, L. C., C. Jose., dan O. K. Robert. 2007. *Histopatologi Dasar edisi ke-8*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kormin, S. 2005. The effect of Heat Processing on Triterpene Glycosides and Antioxidant Activity of Herbal Pegagan (*Centella asiatica*) Drink [Thesis]. Kuala Lumpur : Universiti Teknologi Malaysia.
- Krinke, G. J. 2000. *The Laboratory Rat*. San Diego, CA : Academic Press. Hal 150-152
- Kusriningrum, 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya. 3-15.
- Kusumawati. 2004. *Bersahabat dengan Hewan Coba*. Gadjah Mada University Press.Yogyakarta.



- Leeson, C. R., T. S. Leeson., dan A. A. Paparo. 2006. *Buku Ajar Histopatologi*. Ed. Ke-5. Terj. dari *Textbook of Histology*. 5th ed., oleh Tambajong, J dan Wonodirekso (eds.). Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Lusiana, F. Dhafir, dan Masrianih. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Motilitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) Galur DDY. *Journal E-Jipbiol*. Vol. 2: 24-29, Desember 2013.
- Mughniati, S. 2015. Pengaruh Ekstrak Biji Kapuk (*Ceiba pentandra* Gaertn) Sebagai Obat Kontrasepsi pada Kucing Lokal (*Felis domestica*) ditinjau dari Kualitas Sperma dan Organ Reproduksi Jantan [Skripsi]. Makassar : Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.
- Myres, P. dan D. Armitage. 2004. “*Rattus novergicus*” Animal Diversity. [http://http.www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus\\_novergicus.htm](http://http.www.animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_novergicus.htm) [Diakses tanggal 21 Agustus 2017].
- Pangkahila, W. 2007. *Memperlambat Penuaan, Meningkatkan Kualitas Hidup Anti Aging Medicine*. Cetakan ke-1. Jakarta : Penerbit Buku Kompas. Hal. 133-144.
- Pratama, A. Y., Aulanni'am., dan M. C. Padaga. 2013. Gambaran Histopatologi dan Jumlah Mikroflora Jejunum Tikus Putih (*Rattus novergicus*) yang Terpapar Indometasin dan Mendapat Suplementasi Bakteri Asam Laktat [Skripsi]. Malang : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
- Pratiwi, A. Y. 2011. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Jintan Hitam (*Nigella sativa*) terhadap Integritas Membran Spermatozoa dan Kadar Malondialdehida MDA Epididimis Mencit (*Mus musculus*) yang dipapar Timbal (PB) Asetat Peroral [Skripsi]. Malang : Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Ramadhan. 2008. Aktivasi Antifertilitas Senyawa Bioaktif a-Mangostin dari Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L*) pada Tikus (*Rattus novergicus*) Jantan Galur Wistar. [Disertasi]. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Samsiar, A. Ramadhan, dan D. Tureni. 2013. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Morfologi Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) Galur DDY. *Journal E-Jipbiol.*, Vol. 2: 20-23.
- Samson, E. Dan A. J. A, Unility. 2014. *Ekspresi Immunoglobulin A (Ig A) pada Usus Halus Tikus Putih (Rattus novergicus)*. Seminar Nasional Basic Science VI FMIPA Universitas Padjajaran.
- Sanocka, D and M. Kurpisz. 2004. Reactive Oxygen Species and Sperm Cells. *Journal Reproductive Biology and Endocrinology*. 2(12) : 1-7.



- Setyaningsih, V. R. 2011. Pengaruh Pemberian Infus Simplisia Rosella (*Hibiscus sabariffa* L.) secara Oral terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus* L.) Jantan Galur DDY [Skripsi]. Depok : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Univesitas Indonesia.
- Sikka, C. S. 1996. *Oxidative Stress and Role of Antioxidants in Normal and Abnormal Sperm Function*. Departement of Urology, Tulane University School of Medicine, New Orleans, Lousiana. USA.
- Sikka, S. C. 2014. Role of Oxidative Stess and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. *Journal Androl.* vol 25 page 5-18.
- Soejono, C. H. 2004. Pasien Geriatri dan Permasalahannya. *Artikel Medika*. no. 5 tahun XXX, Mei 2004.
- Solihati, N. 2013. Antifertiitas Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) dan Reversibilitas Fungsi Reproduksi pada Tikus (*Rattus novergicus*) Jantan [Disertasi]. Bogor : Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Sukmaningsih, A., A. Ermayanti., N. Wiratmini, dan Sudatri, W. 2011. Gangguan Spermatogenesis Setelah Pemberian Monosodium Glutamat pada Mencit (*Mus musculus* L.) *Jurnal Biologi* XV (2) : 49-52.
- Sugianto, I. S., Subandi, dan Muntholib. 2013. Fitokimia Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) dan Buah Sirsak (*Annona murcata* L.) Serta Potensinya Sebagai Inhibitor Enzim Xantin Oksidase. *Jurnal Ilmiah Universitas Negeri Malang* (2) : 87-92.
- Sunarjo, I. 2012. Pemberian ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) menurunkan kadar MDA Tikus Putih yang Dipapar Asap Rokok [Thesis]. Denpasar : Program Magister Studi Ilmu Biomedik, Universitas Udayana.
- Suryohusodo, P. Oksidan, Antioksidan dan Radikal Bebas, dalam *Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekular*. Jakarta : CV. Infomedika : 31-47.
- Solikhatin, S., Aulanni'am, dan D. K. Wuragil. 2012. Perubahan Kadar Malondialdehyde (MDA) dan Gambaran Histopatologi Pankreas pada Tikus (*Rattus novergicus*) ITD Hasil Induksi Capra hircus Tiroglobulin (cTg) [Skripsi]. Malang : Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. 1-8.
- Takashi, H., H. Tainaka., M. Umezawa., K. Takeda., K. and T. Hiromitsu. 2011. Evaluation of Testicular Toxicology of Doxorubicin based on Microarray Analysis of Testicular Spesific Gene Expression. *Journal Natl Cancer Inst Monogr.* page 12-17.

- Wardani, E. T. 2010. Pengaruh Ekstrak Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) var. Gajah terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus*) yang Terpapar 2-Methoxythanol [Skripsi]. Surabaya : Universitas Airlangga Surabaya.
- Welsh, M., P. T Saunders.,and M. Frisken. 2008. Identification in Rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *The journal of Clinical Investigation*, no 118 page 1479-1490.
- Widayati, T. D. 2008. *Ilmu Reproduksi Ternak*. Yogyakarta : UGM Press.
- Winarto, W. R. dan M. Surbakti. 2003. *Khasiat dan Manfaat Pegagan*. Jakarta : Agromedia Pustaka.

